

# UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
Área de Nutrición y Bromatología



## ESTUDIO DE MODIFICACIONES QUÍMICAS EN *Capsicum annuum*, L. DURANTE SU CONSERVACIÓN

MARÍA JOSÉ ORUÑA CONCHA

1996

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**  
**Área de Nutrición y Bromatología**

**ESTUDIO DE MODIFICACIONES QUÍMICAS EN**  
***Capsicum annuum*, L. DURANTE SU CONSERVACIÓN**

Memoria presentada por **María José Oruña Concha** en la  
Universidad de Santiago de Compostela para optar al Grado de  
Doctor.

Santiago de Compostela, Diciembre de 1996

**JESÚS SIMAL LOZANO, CATEDRÁTICO DE ANÁLISIS QUÍMICO  
APLICADO, BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA Y JULIA LÓPEZ  
HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**AUTORIZAN** a Dña María José Oruña Concha, Licenciada en Farmacia, a presentar la Tesis titulada "ESTUDIO DE MODIFICACIONES QUÍMICAS EN *Capsicum annuum*, L. DURANTE SU CONSERVACIÓN " para optar al Grado de Doctor en Farmacia, la cual ha sido realizada bajo nuestra dirección en los Laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide la presente en Santiago de Compostela, en Diciembre de mil novecientos noventa y seis.

Fdo: Prof. Dr. D. J. Simal Lozano

Fdo. Dra. Dña J. López Hernández

**RAFAEL CELA TORRIJOS, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**INFORMA** que Dña María José Oruña Concha presenta el trabajo titulado "ESTUDIO DE MODIFICACIONES QUÍMICAS EN *Capsicum annuum*, L. DURANTE SU CONSERVACIÓN" realizado bajo la dirección de los Dres. D. Jesús Simal Lozano y Dña Julia López Hernández, en los Laboratorios de Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela.

Fdo. Dr. D. Rafael Cela Torrijos

Santiago de Compostela, Diciembre de 1996

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>III</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN .</b>	
1.1.- DEFINICIÓN	3
1.2.- CONSERVACIÓN	6
1.3.- NOTAS DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS	
1.3.1.- HUMEDAD	8
1.3.2.- PIGMENTOS	9
1.3.3.- AROMA	11
1.3.4.- CAPSAICINOIDES	15
1.3.5.- VITAMINA C	17
1.3.6.- ÁCIDOS ORGÁNICOS	18
1.3.7.- CARBOHIDRATOS	19
1.3.8.- ÁCIDOS GRASOS	22
<b>2.- OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.- PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1.- MUESTREO	31
3.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS	
3.2.1.- HUMEDAD	33
3.2.2.- PIGMENTOS	34
3.2.3.- COMPUESTOS AROMÁTICOS	37
3.2.4.- CAPSAICINOIDES	42
3.2.5.- ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINA C	44
3.2.6.- CARBOHIDRATOS	
3.2.6.1.- AZÚCARES, ALMIDÓN Y PECTINAS	46
3.2.6.2.- FIBRA INSOLUBLE	49
3.2.7.- ÁCIDOS GRASOS	51
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1.- METODOS ANALÍTICOS	
4.1.1.- CAPSAICINOIDES	57
4.1.2.- ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINA C	58
4.2.- COMPOSICIÓN	59

4.3.- CONSERVACIÓN	
4.2.1.- EVOLUCIÓN DE LOS PIGMENTOS	72
4.2.2.- EVOLUCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL AROMA	78
4.2.3.- EVOLUCIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES	97
4.2.4.- EVOLUCIÓN DE LA VITAMINA C Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	100
4.2.5.- EVOLUCION DE LOS CARBOHIDRATOS	108
4.2.6.- EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	114
 5.- CONCLUSIONES	 126
 6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 131

## **ABREVIATURAS**

**A:** Absorbancia

**AIS:** Alcohol Insoluble Solids

**ANOVA:** Analysis Of Variance

**Art:** Artículo

**BOE:** Boletín Oficial del Estado

**col:** colaboradores

**DOCE:** Diario Oficial de las Comunidades Europeas

**FAME:** Fatty Acid Methyl Esters

**FID:** Flame Ionization Detector

**Fig:** Figura

**GC-MS:** Gas Chromatography-Mass Spectrometry

**Hg:** Mercurio

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography

**M:** Molar

**m.f. :** muestra fresca

**m.s. :** muestra seca

**N:** Normalidad

**p/v:** Peso/volumen

**RRT:** Relative Retention Time

**RSD:** Relative Standard Desviation

**UV/VIS:** Ultravioleta/visible

<b>TABLA I.-</b> Composición química del pimiento común o dulce según diferentes autores.	5
<b>TABLA II.-</b> Programa de gradiente empleado para la separación de los pigmentos.	35
<b>TABLA III.-</b> Composición química del pimiento tipo Padrón.	60
<b>TABLA IV.-</b> Evolución del contenido en clorofila“a” en pimientos envasados manualmente y a vacío congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	74
<b>TABLA V.-</b> Evolución del contenido en clorofila“b” en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	75
<b>TABLA VI.-</b> Evolución del contenido en luteína en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	76
<b>TABLA VII.-</b> Evolución del contenido en b-caroteno en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	77
<b>TABLA VIII.-</b> Relación de los compuestos volátiles identificados en el pimiento tipo Padrón fresco (entero (F) y triturado (T)), congelado, con y sin vacío (V y N, respectivamente), y liofilizado (L).	86
<b>TABLA IX.-</b> ANOVA correspondiente a los “frutos enteros” (Frescos y congelados, con y sin vacío).	88
<b>TABLA X.-</b> ANOVA correspondiente a los “frutos triturados” (Frescos y Liofilizados).	89
<b>TABLA XI.-</b> ANOVA correspondiente a los “frutos frescos” (Enteros y Triturados).	90
<b>TABLA XII.-</b> Evolución del contenido en vitamina C en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	102
<b>TABLA XIII.-</b> Evolución del contenido en ácido málico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	103
<b>TABLA XIV.-</b> Evolución del contenido en ácido oxálico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	104
<b>TABLA XV.-</b> Evolución del contenido en ácido quínico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	105
<b>TABLA XVI.-</b> Evolución del contenido en ácido cítrico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	106
<b>TABLA XVII.-</b> Evolución del contenido en ácido fumárico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)	107
<b>TABLA XVIII.-</b> Evolución del contenido en fructosa en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)	109
<b>TABLA XIX.-</b> Evolución del contenido en glucosa en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)	110
<b>TABLA XX.-</b> Evolución del contenido en almidón en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)	111



<b>TABLA XXI.-</b> Evolución del contenido en pectinas en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)	112
<b>TABLA XXII.-</b> Evolución del contenido en fibra insoluble en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)	113
<b>TABLA XXIII.-</b> Evolución del contenido en ácido palmítico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	118
<b>TABLA XXIV.-</b> Evolución del contenido en ácido esteárico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	119
<b>TABLA XXV.-</b> Evolución del contenido en ácido araquídico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	120
<b>TABLA XXVI.-</b> Evolución del contenido en ácido oleico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	121
<b>TABLA XXVII.-</b> Evolución del contenido en ácido linoleico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	122
<b>TABLA XXVIII.-</b> Evolución del contenido en ácido linolénico en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)	123

<b>Figura 1.-</b> Estructura química de los capsaicinoides presentes de forma natural en los capsicums.	16
<b>Figura 2.-</b> Dispositivo de purga térmica.	38
<b>Figura 3.-</b> Desorbedor térmico Rektorik MW-1A.	39
<b>Figura 4.-</b> Desorbedor-GC-MS.	40
<b>Figura 5.-</b> Unidad de extracción “Dosi Fiber”.	49
<b>Figura 6.-</b> Cromatograma de una solución patrón de carotenoides y clorofilas.	61
<b>Figura 7.-</b> Cromatograma de carotenoides y clorofilas correspondiente a una muestra de pimiento tipo Padrón fresco.	62
<b>Figura 8.-</b> Espectro visible de las xantofilas minoritarias.	63
<b>Figura 9.-</b> Espectro visible de la luteína.	64
<b>Figura 10.-</b> Espectro visible de clorofilas.	65
<b>Figura 11.-</b> Espectro visible del $\beta$ -caroteno.	66
<b>Figura 12.-</b> Cromatograma de una solución patrón de vitamina C y ácidos orgánicos.	67
<b>Figura 13.-</b> Cromatograma de vitamina C y ácidos orgánicos correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.	68
<b>Figura 14.-</b> Determinación de azúcares. a) Cromatograma de una solución patrón de azúcares. b) Cromatograma de azúcares correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.	69
<b>Figura 15.-</b> Determinación de almidón. a) Cromatograma de una solución patrón de glucosa. b) Cromatograma de almidón (como glucosa) correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.	70
<b>Figura 16.-</b> Determinación de pectinas. a) Cromatograma de una solución patrón de ácido galacturónico. b) Cromatograma de pectinas (como ácido galacturónico) correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.	71
<b>Figura 17.-</b> Evolución del contenido en clorofila“a” en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	74
<b>Figura 18.-</b> Evolución del contenido en clorofila“b” en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	75
<b>Figura 19.-</b> Evolución del contenido en luteína en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	76
<b>Figura 20.-</b> Evolución del contenido en $\beta$ -caroteno en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	77
<b>Figuras 21.-</b> TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón fresco (a), y tras someterle al proceso de congelación, con y sin vacío (b y c, respectivamente).	83
<b>Figura 22.-</b> TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón fresco: (a) Fruto Entero y (b) Fruto Triturado.	84
<b>Figura 23.-</b> TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón: (a) Fruto Fresco Triturado y (b) Fruto Liofilizado.	85

<b>Figura 24.-</b> “Perfil aromático” del pimiento tipo Padrón fresco entero (a) y congelado con y sin vacío (b y c, respectivamente)	91
<b>Figura 25.-</b> “Perfil aromático” del pimiento tipo Padrón fresco: (a) Fruto Entero y (b) Fruto triturado.	92
<b>Figura 26.-</b> “Perfil aromático” del pimiento tipo Padrón fresco triturado (a) y liofilizado (b).	93
<b>Figura 27.-</b> Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco y congelado (con y sin vacío).	94
<b>Figura 28.-</b> Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco (entero y triturado).	95
<b>Figura 29.-</b> Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco (triturado) y liofilizado.	96
<b>Figura 30.-</b> Determinación de capsaicina y dehidrocapsaicina. (a) Cromatograma de una solución patrón de capsaicina (1) y dehidrocapsaicina (2), (b) Cromatograma de capsaicina y dehidrocapsaicina correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.	98
<b>Figura 31.-</b> Espectro UV-Vis de la Capsaicina.	99
<b>Figura 32.-</b> Evolución del contenido en vitamina C en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	102
<b>Figura 33.-</b> Evolución del contenido en ácido málico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	103
<b>Figura 34.-</b> Evolución del contenido en ácido oxálico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	104
<b>Figura 35.-</b> Evolución del contenido en ácido quínico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	105
<b>Figura 36.-</b> Evolución del contenido en ácido cítrico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	106
<b>Figura 37.-</b> Evolución del contenido en ácido fumárico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.f.)	107
<b>Figura 38.-</b> Evolución del contenido en fructosa en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (g/100g m.f.)	109
<b>Figura 39.-</b> Evolución del contenido en glucosa en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (g/100g	

m.f.)	110
<b>Figura 40.-</b> Evolución del contenido en almidón en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (g/100g m.f.)	111
<b>Figura 41.-</b> Evolución del contenido en pectinas en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (g/100g m.f.)	112
<b>Figura 42.-</b> Evolución del contenido en fibra insoluble en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (g/100g m.f.)	113
<b>Figura 43.-</b> Cromatograma de una solución patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos.	116
<b>Figura 44.-</b> Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos correspondiente a una muestra de pimiento tipo Padrón congelado manualmente.	117
<b>Figura 45.-</b> Evolución del contenido en ácido palmítico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	118
<b>Figura 46.-</b> Evolución del contenido en ácido esteárico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	119
<b>Figura 47.-</b> Evolución del contenido en ácido araquídico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	120
<b>Figura 48.-</b> Evolución del contenido en ácido oleico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	121
<b>Figura 49.-</b> Evolución del contenido en ácido linoleico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	122
<b>Figura 50.-</b> Evolución del contenido en ácido linolénico en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados (PL). (mg/100g m.s.)	123

# **1. INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1.- DEFINICIÓN

La hortaliza seleccionada para llevar a cabo el trabajo es el pimiento tipo Padrón (*Capsicum annuum* L.) tan apreciado en la Comunidad Gallega.

La denominación de hortalizas, comprende un amplio y diverso grupo de alimentos de origen vegetal de difícil definición en el que comúnmente se engloban todos los productos vegetales que no son frutas, cereales o frutos secos. Botánicamente es un grupo complejo, en el que se encuentran representadas familias muy diferentes, así como distintas partes de las plantas: frutos, hojas, yemas, tubérculos, raíces y bulbos. (Primo Yúfera, 1979).

Según el Código Alimentario Español (1980), con la denominación genérica de hortaliza se designa a "cualquier planta herbácea hortícola en sazón que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada".

“A efectos de este Código, se establece la siguiente clasificación:

- a) Por la parte de la planta a la que pertenecen: Frutos, bulbos, coles, hojas y tallostiernos, inflorescencias, legumbres verdes, pepónides, raíces y tallos jóvenes.
  - b) Por su forma de presentación al consumidor: hortalizas frescas, desecadas, deshidratadas y congeladas.
  - c) Por su calidad comercial: Las que determine la reglamentación correspondiente”.
- Según esta clasificación, los pimientos se incluyen en el grupo a), como frutos.

El pimiento tipo Padrón no es mencionado en la Legislación Española hasta 1983 (BOE del 23 de septiembre), en el que se consideran pimientos frescos los frutos de las variedades (cultivares) procedentes de la especie *Capsicum annuum*, L., destinados al consumo humano en estado fresco, con excepción de la guindilla y de los pimientos destinados a la transformación industrial.

El género botánico *capsicum* ha jugado un papel muy importante en la alimentación y la medicina durante muchos siglos. En la alimentación, su principal aplicación está basada en sus cualidades picantes, si bien existen zonas donde se utiliza como conservante. En el área de la Farmacología tiene diversas aplicaciones, externamente, ya sea en forma de tintura, ungüento o parche actúa como estimulante y rubefaciente, propiedad esta última de gran alivio en enfermedades como reumatismo, lumbago y neuralgias, internamente además de estimulantes son carminativas.

Fue descubierto durante el segundo viaje de Colón a la isla de Santo Domingo, de esta forma los frutos del género *capsicum* ganaron rápidamente importancia y aceptación. A mediados del siglo XVI,

---

comenzó a usarse desecado y molido con fines medicinales en Europa. Rápidamente se propagó por toda Europa y la India.

Actualmente, existen muchas variedades de *capsicum* debido a las diferencias en las condiciones climáticas necesarias para su crecimiento, según las zonas donde se cultive, que implican cambios físicos y químicos que afectan a la variedad del fruto. Así, por ejemplo, en África, India y China se desarrolla un pimiento pequeño y muy picante que se conoce como “chillies”; en Hungría y España se utiliza el término de “pimienta” para designar a un pimiento más grande pero que no pica tanto, y las variedades cuyo contenido en picante está entre los chillies y la pimienta se denominan “pimientos rojos”.

Los pimientos tipo Padrón se caracterizan por tener la superficie ligeramente rugosa y ser de color verde brillante. Se comercializan cuando aún no han alcanzado la madurez, y miden 3-5 cm de longitud y 1-2 cm de ancho en la base. Su forma es cónica o troncocónica, ligeramente rugoso y marcado en el ápice los 3 ó 4 cantos. Son de color verde brillante ligeramente claro. Presentan un aroma característico como consecuencia probablemente de las condiciones climáticas, cuidadosa selección de las semillas (se cree que fueron los Padres Franciscanos quienes trajeron las semillas a la comarca de Padrón, siendo conservado hasta nuestros días por los agricultores) y/o de los métodos de cultivo usados. Su sabor generalmente no es picante, aunque algunas variedades contienen altos niveles de capsaicina, la cual se forma durante la maduración del fruto y es el principal responsable del sabor picante en los pimientos.

Estos frutos, por su gran difusión de cultivo en Galicia, tienen gran peso dentro de la economía de esta comunidad y particularmente en el ayuntamiento de Padrón. Los pimientos tipo Padrón se consumen casi exclusivamente en estado fresco, lo cual hace interesante la búsqueda de un método de conservación adecuado para que, siempre y cuando se mantengan las características organolépticas y nutritivas de los mismos, se pueda incrementar su consumo en el tiempo (las hortalizas se caracterizan por su estacionalidad y por ser alimentos especialmente perecederos) y en el espacio (se pueden alcanzar mayores distancias mediante el uso de un sistema de conservación adecuado). En este Departamento se ha realizado un estudio de “tipificación del pimiento tipo Padrón producido en Galicia” (Vázquez-Odériz, 1988).

En la Tabla I se recoge la composición química del pimiento común o dulce según diversos autores.

**Tabla I.- Composición química del pimiento común o dulce según diferentes autores.**

COMPONENTE	UNIDADES	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
HUMEDAD	g/100g m.f.	91.0	92.8	91.0	94	92	94	93.4	92.8	91
PROTEINAS	“	0.9	1.2	1.2	0.9	1.10	0.90	1.20	1.10	0.90
GRASA	“	0.2	0.2	0.33	0.4	0.20	0	0.30	0.30	0.20
HC TOTALES	“	3.7	5.3	4.7	-	2.90	2.2	3.4	3.5	3.7
FIBRA	“	1.2	1.4	2.2	2.2	0.70	-	1.4	1.40	1.2
CALCIO	mg/100g m.f.	12	9	-	9	-	9	-	9	12
MAGNESIO	“	11	12	-	-	-	-	-	13	11
HIERRO	“	0.5	0.4	0.6	0.4	-	0.40	-	0.70	0.5
SODIO	“	0.5	4.2	-	-	-	2	-	5	0.5
POTASIO	“	210	186	-	-	-	-	-	205	210
FÓSFORO	“	25	25	-	-	-	-	-	26	25
VITAMINA C	“	131	128	128	100	-	100	128	126	131
RIBOFLAVINA	“	0.04	-	0.08	-	-	0.03	0.08	0.05	0.04
TIAMINA	“	0.05	-	0.06	-	-	0.08	0.08	0.06	0.05
LUTEINA	“	-	-	-	-	-	-	40.8	-	-
β-CAROTENO	“	0.4	0.25	0.25	-	4.9	-	13.4	-	-

(1) SECHI, G. (1967)

(2) DIEM, K. y LENTER, C. (1975) Documento Geigy (1975)

(3) PRIMO YUFERA, E. (1979)

(4) HAWTHORN, J. (1983)

(5) RICO AVILA, J. (1983)

(6) BUSS, D. y *col.* (1987)

(7) BELITZ, H.D. y GROSCH, W. (1988)

(8) FEINBERG, M. y *col.* (1991)

(9) MATAIX, J. (1993)



---

## **1.2.- CONSERVACIÓN**

Los productos de origen vegetal se caracterizan por su estacionalidad y por ser especialmente perecederos, sufriendo a partir de su recolección un rápido deterioro de su calidad a la temperatura ambiente.

Por la dinámica de la sociedad actual nos vemos obligados a consumir dichos alimentos algún tiempo después de su adquisición, por lo que debemos someterlos a una correcta conservación para impedir no sólo su deterioro sino el mínimo de pérdidas de nutrientes.

La conservación se realiza mediante técnicas diferentes, siendo la más usual el frío, mediante los procesos de congelación y liofilización, entre otros.

### **1.2.1.- Conservación en frío: congelación**

Consiste en bajar la temperatura por debajo del punto de congelación en el núcleo del alimento (en frutas y verduras oscila entre -0.3 y -3°C (Rodríguez Hurtado, 1983), para bloquear así toda posibilidad de desarrollo microbiano y limitar la acción de las principales enzimas y la mayoría de reacciones químicas. Seguidamente el alimento se almacena a -18°C (DOCE de 21 de Diciembre de 1988), temperatura que debe mantenerse hasta el momento de su utilización.

En lo que afecta al valor nutricional y calidades organolépticas, se considera la congelación como una de las mejores técnicas de conservación. No obstante, hay datos que evidencian la pérdida considerable del contenido final en nutrientes, como consecuencia de factores tales como la calidad del alimento a congelar, técnicas empleadas, tiempo de conservación y las fases finales de descongelación, recalentamiento o cocción, durante las que se producen fenómenos de oxidación y solubilización.

Como regla general, si el alimento fresco está en buen estado, el producto congelado será de buena calidad siempre que se conserve durante un tiempo razonable a temperatura adecuada, ya que al cabo de unos meses de estancia en el congelador, el contenido en vitaminas tiende a disminuir y las grasas a hacerse rancias. Así mismo, la descongelación debe hacerse rápidamente, ya que, aunque es prácticamente imposible la proliferación microbiana a esas temperaturas tan extremas, puede no obstante, conservar algunos microorganismos tales como esporas de anaerobios y ciertos coliformes.

---

### 1.2.2.- Conservación por liofilización

La liofilización o criodeshidratación, se basa en la propiedad de que una solución congelada se puede *sublimar* en ciertas condiciones: el hielo, al vacío y a temperatura inferior a  $-30^{\circ}\text{C}$ , pasa del estado gaseoso al de vapor sin pasar por el estado líquido.

Las ventajas de este sistema de conservación son las siguientes:

- Todo el proceso se realiza a bajas temperaturas lo que permite realizar la desecación de numerosos productos termolábiles, incluso a temperatura ambiente, como es el caso de un gran número de materiales biológicos.
- La baja volatilidad de un gran número de compuestos a las temperaturas a las que se realiza el proceso. Por esta razón en los productos liofilizados van a permanecer la mayor parte de las sustancias volátiles presentes en el producto inicial.
- Ausencia de espuma, que es uno de los principales problemas de la desecación a vacío. Esto se debe a que se trabaja con producto congelado.
- Rápida dispersión del producto liofilizado, es decir, el producto inicial se obtiene casi de manera instantánea por simple adición de agua.
- Ausencia de crecimiento bacteriano: En los productos liofilizados no se desarrollan microorganismos debido a que la humedad residual es muy pequeña.

Este costoso procedimiento (la inversión de capital en maquinaria es importante) se emplea principalmente en la conservación de productos de alto precio tales como las vacunas. No obstante, el sistema tiende a extenderse para la conservación de alimentos: polvos de setas que conservan todo el aroma al ser mezclados en las sopas, leches infantiles, zumos de frutas, frutos, legumbres, huevos, extractos de café, té, infusiones,... e incluso carnes y pescado. Después de una rehidratación, su valor nutritivo y sus cualidades organolépticas son prácticamente las mismas que las del alimento fresco (Belitz y Grosch, 1988).

---

### 1.3.- CARACTERISTICAS DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS.

#### 1.3.1.- HUMEDAD

La humedad o contenido en agua de las hortalizas, es normalmente, alta, oscilando entre el 75 y el 95% (Primo Yúfera, 1979); en algunos casos, como el pepino y la lechuga, esta cifra se acerca al 95%, si bien, en otros casos, apenas supera el 50%, tal es el caso de los tubérculos amiláceos (Wills y *col.*, 1984).

El contenido en agua de una determinada hortaliza puede variar considerablemente, incluso dentro de la misma especie, y si existen variaciones diurnas de temperatura oscilará también a lo largo del día; esto debe tenerse en cuenta a la hora de proceder a la recolección del vegetal, pues éste resulta más crujiente cuando el contenido en agua es más elevado (Wills y *col.*, 1984). Constituye el medio en el que se verifican las reacciones químicas y participa como sustrato en las de hidrólisis (Belitz y Grosch, 1988).

En las hortalizas, está presente en distintos estados:

- agua libre o solvente, conservando las propiedades del agua pura,
- agua capilar y agua adsorbida en la superficie constituyendo formas intermedias, medianamente activas,
- agua de constitución, intimamente unida a los otros compuestos bioquímicos de los que no puede separarse más que por técnicas severas. Este agua ha perdido sus propiedades y no ejerce presión de vapor.

Desde el punto de vista químico y biológico, el concepto esencial es lo que se conoce como “actividad de agua ( $a_w$ )”, que se define como la disponibilidad del agua para intervenir en reacciones de cualquier tipo y es el cociente entre la presión de vapor del alimento y la del agua pura, a la que arbitrariamente se le atribuye el valor uno. Por regla general, las reacciones químicas ocurren a actividades de aguas bajas, de 0.2 a 0.4; las reacciones enzimáticas comienzan a niveles del orden de 0.4 ó 0.5; la proliferación de levaduras y mohos a 0.7 y la de las bacterias a partir de 0.9 (Adrian y Frangne, 1990).

La humedad puede ser determinada por diferentes métodos tales como: desecación en estufa (Simal-Lozano y *col.*, 1986; AOAC, 1990), desecación en estufa de vacío (Moreno y *col.*, 1983; Ranganna 1986), desecación en horno microondas (García Villanova y *col.*, 1988), destilación con solventes inmiscibles (Moreno Martin y De La Torre Boronat, 1983; Simal-Lozano y *col.*, 1986), desecación por liofilización (Simal-Lozano y *col.*, 1986), método de Karl-Fisher (Ranganna, 1986), radiación infrarroja y resonancia magnética nuclear (Ranganna, 1986), entre otros.

---

### 1.3.2.- PIGMENTOS

El color es un carácter organoléptico de suma importancia en los alimentos, pudiéndose usar como criterio de calidad, ya que los pigmentos responsables pueden verse muy modificados con distintas operaciones de procesado (Chen y *col.*, 1995).

Las frutas y las verduras son los productos que contienen la mayor concentración de pigmentos (Badui Dergal, 1981), siendo los carotenoides los más importantes de origen vegetal. Se encuentran localizados en el protoplasma de las células vegetales.

#### 1.3.2.1.- Carotenoides

Los carotenoides, junto con las clorofilas, están presentes en la mayoría de los vegetales fotosintéticos, ya que absorben luz al igual que éstas. Se pueden dividir en dos grandes grupos: *carotenos*, que son estrictamente hidrocarburos, y *xantofilas*, forma oxigenada de los carotenos. Los carotenoides predominantes en los vegetales verdes son la luteína y el  $\beta$ -caroteno (Heinonen y *col.*, 1989).

En los vegetales verdes, debido a que la clorofila es más abundante y más intensa en color, los carotenoides suelen estar enmascarados, de ahí que se distingan mejor en plantas jóvenes cuando la clorofila aún no está desarrollada en grandes concentraciones.

Son compuestos liposolubles de color amarillo, naranja y rojo, ampliamente distribuidos en la naturaleza y solubles en disolventes orgánicos apolares.

El interés de los carotenoides se ha incrementado recientemente no sólo como precursor de la vitamina A (esencial para la visión con poca luz y mantener sanos la piel y los tejidos superficiales) (Buss y *col.*, 1987), sino también como posible inhibidor de cáncer (Harris y *col.*, 1991) y úlceras (Mozsik y *col.*, 1984). Su destrucción reduce el valor nutritivo de los alimentos, e induce una decoloración y una pérdida de sus características organolépticas (Badui Dergal, 1981).

#### 1.3.2.2.- Clorofilas

La clorofila es el pigmento verde que se localiza en los cloroplastos de las plantas y a través del cual se realiza la fotosíntesis, proceso de mucha importancia en la vida de todos los organismos, ya que es el principal mecanismo por el cual se sintetizan los diferentes carbohidratos que se encuentran en la naturaleza..

En los vegetales verdes, las clorofilas predominantes son las clorofilas *a* y *b*, que generalmente se encuentran en la proporción 3:1 en plantas superiores (Belitz y Grosch, 1988).

---

Este pigmento tiene una estructura porfirínica con un átomo de magnesio y una molécula de fitol que se esterifica con una molécula de ácido propiónico. Dicha estructura es fácilmente alterable, lo que origina cambios tales como (Badui, 1981):

a) la sustitución del grupo magnesio por hidrógeno (feofitinización) que se traduce en una desaparición del color verde originándose unos pigmentos denominados *feofitinas*, de color verde oliva pardo.

b) la eliminación de la cadena de fitol, originando la transformación de la feofitina en el *feofóbido* correspondiente. Señalar que los feofóbidos también se pueden originar a partir de la clorofila por la eliminación primero del grupo fitol, dando lugar a los *clorofilidos*, de igual color y propiedades espectroscópicas que la clorofila, seguido de la eliminación del magnesio.

c) la ruptura del anillo tetrapirrólico con la consecuente pérdida total del color.

La aparición de feofitinas ocurre en medio ácido, intensificándose si está acompañado o precedido por un tratamiento térmico que desnaturaliza la propoteína ligada a la clorofila, favoreciendo así la actuación de los ácidos orgánicos de los vegetales. Si el calentamiento es excesivo, se producen ácidos orgánicos, tales como el ácido acético, responsables ahora de dicha transformación. Su formación se ha intentado evitar adicionando al agua de cocción pequeñas cantidades de bicarbonato sódico, pero dichas condiciones alcalinas repercuten negativamente sobre la textura, sabor y aroma de los vegetales, además de favorecer la pérdida de vitamina C, por lo que es más habitual el empleo de sales cúpricas para formar clorofilinas cúpricas que no se destruyen por el calor en medio ácido y que son las responsables del color “verde luminoso” característico de algunas conservas vegetales. Sin embargo, las sales cúpricas también han dejado de usarse por razones toxicológicas (Primo Yúfera, 1979).

La acción de la enzima clorofilasa provoca la pérdida del grupo fitol, originándose los clorofilidos correspondientes. Este fenómeno sucede durante la maduración y almacenamiento de vegetales frescos (Primo Yúfera, 1979).

La clorofila también puede ser degradada por la acción de los hidroperóxidos formados durante la oxidación de las grasas insaturadas y por las radiaciones (Badui Dergal, 1981).

Los cambios de color se utilizan como índice de calidad, y por lo tanto la relación de clorofila a feofitina se puede emplear como medida de deterioro en los vegetales (Badui Dergal, 1981).

Desde el punto de vista nutritivo, las clorofilas son importantes por su aporte de magnesio a la dieta (Buss y col., 1988).

---

Entre los métodos para la determinación de pigmentos vegetales destacan métodos espectroscópicos (White y *col.*, 1972; Ranganna, 1986; Yoder y Daley, 1990) y cromatográficos, desde la cromatografía en capa fina (Sievers y Hynninen, 1977; Padula y Rodríguez-Amaya, 1987) hasta la cromatografía líquida de alta resolución (Granado y *col.*, 1992; López-Hernández y *col.*, 1993; Saitoh y *col.*, 1995), que es actualmente la técnica más empleada.

### **1.3.3.- AROMAS**

El aroma, junto con el sabor, está reconocido como uno de los atributos de calidad más importantes de los alimentos, ya que la especie humana, al igual que otras especies animales, han seleccionado su alimentación desde los tiempos más remotos, tanto por su aspecto visual como por la sensación agradable o desagradable producida en los órganos receptores del olor y del sabor (Alberola e Izquierdo, 1979), más que por su contenido vitamínico.

Los órganos de los sentidos responsables de la detección del gusto y del aroma (sensaciones colectivamente englobadas en el término inglés "flavour"), han evolucionado para desempeñar una función esencial, establecer qué es y qué no es apto como alimento (Coulter, 1984).

Este atributo de calidad, conocido desde tan antiguo, ha tardado mucho tiempo en ser analizado científicamente, y, a pesar de los avances analíticos, el origen químico de algunos componentes del aroma y sabor es todavía desconocido. Esto es debido, a que algunas sustancias están presentes en proporciones realmente bajas, que por sí solas no tienen ni un aroma ni un sabor intenso, y que pasan desapercibidas para el analista, pero que tienen una gran influencia sobre el aroma y sabor final del alimento.

Las sustancias aromáticas, a diferencia de los compuestos responsables del sabor (normalmente polares, solubles en agua y poco o nada volátiles), son compuestos volátiles, se perciben por los receptores del olor del órgano olfatorio y poco polares que provocan una amplia gama de sensaciones. En ocasiones, el concepto de sustancias aromáticas se utiliza laxamente, ya que un compuesto puede contribuir al olor o sabor típico de un alimento, en tanto que en otro alimento puede causar un olor o sabor anormal, o ambos.

Entre los compuestos no volátiles de los alimentos, algunos tienen incidencia, no sólo como precursores de aromas (azúcares, aminoácidos, vitaminas) sino también como sabores propios (Medina y *col.*, 1994).

---

El aroma típico de un fruto viene dado por la proporción de mezcla de determinados compuestos, más que por la presencia de sustancias características, ya que se encuentran prácticamente los mismos componentes en frutas diferentes, pero en distintas proporciones (Luthi, 1958).

El aroma va a permitir comparar las características organolépticas de distintas variedades (Paillard, 1967), seguir la evolución de la calidad en función del almacenamiento en atmósfera controlada (Willaert y *col.*, 1983), e incluso predecir la fecha óptima de cosecha para frutos que van a ser almacenados posteriormente (Dirinck y *col.*, 1989).

Según Medina y *col.*, 1994, la formación de compuestos volátiles en los alimentos tiene lugar a partir de:

a) Los procesos enzimáticos y de fermentación que intervienen en los alimentos en estado natural.

Las enzimas juegan un papel muy importante en las propiedades organolépticas de los alimentos, especialmente en los productos lácteos, bebidas fermentadas (vino, cerveza...), carnes, frutas y legumbres (zumos, purés, jarabes) y productos cocinados.

Señalar también que en el curso de tratamientos de secado, de almacenamiento, etc, los alimentos pierden sus cualidades olfativas y gustativas, las cuales pueden minorizarse añadiendo enzimas o microorganismos apropiados.

b) Reacciones de Maillard, que se producen cuando los alimentos a distintos tratamientos con el fin de prepararlos o conservarlos.

Globalmente esta reacción tiene como precursores a los aminoácidos y a los azúcares reductores. Las diferentes etapas conducen, por una parte, a la formación de compuestos volátiles que constituyen el aroma propiamente dicho; y por otra, a la formación de pigmentos pardos (melanoidinos).

Las principales características de las sustancias responsables del aroma de los alimentos son: la volatilidad, la elevada solubilidad en disolventes orgánicos y la relativa baja solubilidad en agua, y en ellas se apoyan la mayoría de los métodos desarrollados para analizar este tipo de sustancias (Mateos y Carbonell, 1990).

Si se quiere conocer la naturaleza química de los constituyentes volátiles, son necesarias cuatro etapas perfectamente definidas (Alberola e Izquierdo, 1979):

- 1) Separación de la fracción volátil del material no volátil.
- 2) Concentración de la fracción volátil.
- 3) Fraccionamiento de dicha fracción en los distintos componentes.
- 4) Identificación de los componentes separados.

---

Los métodos de aislamiento y concentración son muy variados ya que están en función, no sólo de las características físico-químicas de los compuestos volátiles (presión de vapor, solubilidad, polaridad, tamaño, etc.), sino también de la naturaleza del alimento, de su composición y de su consistencia. Entre las técnicas empleadas para tal fin se encuentran:

a) Destilación de la muestra, pudiéndose realizar ésta en un sistema abierto (a presión atmosférica, a presión reducida, o a alto vacío), con arrastre de vapor, fraccionada o con entrada de un gas auxiliar (aire o nitrógeno) (Sagrero-Nieves y *col.*, 1989).

b) Extracción sólido-líquido, siendo el carbón activo uno de los adsorbentes más utilizados (Pérez y *col.*, 1993), ahora cada vez más sustituido por los polímeros porosos tales como Tenax o Porapak (Sauri y *col.*, 1988). Se aplican principalmente en muestras acuosas.

c) Extracción líquido-líquido con disolventes tales como: hexano (Gómez y *col.*, 1993), isopentano, diclorometano (Barbeni y *col.*, 1990), éter-pentano (Brunke y *col.*, 1989; Kerrola y *col.*, 1994), freón, sulfuro de carbono y dióxido de carbono, entre otros, ya que es difícil encontrar un disolvente universal.

d) Arrastre con gas inerte (He, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>,...) de forma continua sin alcanzar el equilibrio, seguido de una posterior concentración de los volátiles mediante condensación criogénica o por atrapamiento mediante adsorción e incluso absorción. El proceso de recuperación es generalmente largo (Naik y *col.*, 1989; Kerrola y *col.*, 1994).

e) Técnicas de espacio de cabeza, lo cual implica la inyección directa de la fase gaseosa en equilibrio con la muestra en un espacio confinado. La composición de los vapores en espacio de cabeza dependerá en gran medida de la presión de vapor del componente y de la naturaleza del sustrato matriz. Estas técnicas permiten mostrar la importancia relativa de un compuesto específico en el conjunto de la percepción, pero, debido a que el volumen inyectado en el espacio de cabeza es muy pequeño, sólo aquellos compuestos que por su concentración y volatilidad relativa estén presentes en cantidades suficientes para dar respuesta en el detector, podrán ser controlados (Nísperos-Carriedo y Shaw, 1990; Shinohara y *col.*, 1991; Wilson y *col.*, 1992; Ohsumi y *col.*, 1993; Buttery y *col.*, 1994; Luning y *col.*, 1994; Van Ruth y *col.*, 1995).

f) Desmixtura: es decir, la formación de dos fases a partir de una mezcla homogénea de agua y un disolvente orgánico miscible por adición de sales minerales.

g) Inyección directa de la muestra. Especialmente indicada para aquellos compuestos cuya concentración sea superior a 10mg/L. Presenta el inconveniente de introducir simultáneamente componentes poco o nada volátiles (azúcares, sales minerales,...) que podrían dar depósitos en el inyector.



---

Los métodos de fraccionamiento e identificación, por su parte, deben ser sensibles y selectivos, ya que los aromas alimentarios son mezclas muy complejas. Las técnicas más utilizadas en esta ocasión son:

1) Cromatografía de Gases: utilizada no solamente para separar compuestos volátiles, sino también para determinar la calidad de los aromas. Han de ser considerados los tipos de columna y naturaleza de su fase estacionaria, caudal del gas portador, temperatura, cantidad de muestra y uso de separador. El detector más utilizado es el de ionización de llama (FID) acoplado a la espectrometría de masas (MS) (Chitwood y *col.*, 1983; Shinohara y *col.*, 1991; Wilson y *col.*, 1992; Shiota, 1993; Gómez y *col.*, 1993; Van Ruth y *col.*, 1994; Luning y *col.*, 1994; Van Ruth y *col.*, 1995). Es el método más adecuado para llevar a cabo estos análisis, ya que permite obtener una alta resolución en estas mezclas tan complejas como son los aromas alimentarios.

2) Cromatografía Líquida: técnica complementaria de la cromatografía gaseosa, que, aunque actualmente en auge, sin embargo, requiere un tiempo de análisis largo, no disponiéndose de detectores universalmente sensibles y siendo el acoplamiento con la espectrometría de masas aún complicado. Se presta particularmente al análisis de los compuestos olorosos menos volátiles (Barron, 1991).

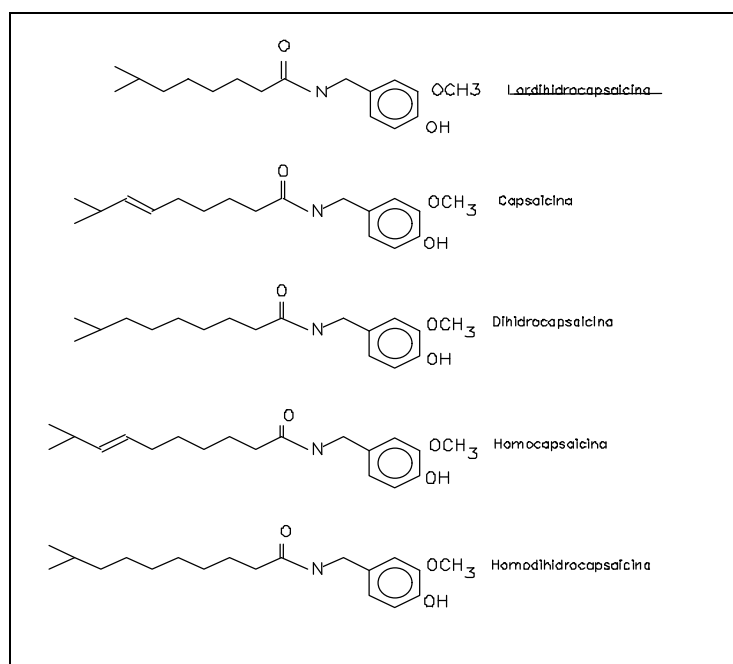
3) Cromatografía de Fluídos Supercríticos: especialmente indicada para compuestos poco volátiles con un alto punto de ebullición. La fase móvil utilizada más frecuentemente es el CO<sub>2</sub> ya que tiene la particularidad de no interferir con la mayoría de los métodos de detección (Sinha y *col.*, 1992; Reverchon y Senatore, 1994).

#### **1.3.4.- CAPSAICINOIDES**

Los compuestos químicos responsables del sabor picante de los pimientos que han hecho que estos frutos sean conocidos en todo el mundo se denominan capsaicinoides. Su acumulación en los frutos de las especies del género *capsicum* está relacionado con la edad, tamaño, estado de desarrollo y contenido en carotenoides de los mismos (Sakamoto y *col.*, 1979).

Los capsaicinoides son un grupo de alcaloides derivados estructuralmente de la amida ácida de la vainillilamina de ácidos grasos C9-C11 ramificados. Han sido identificados y cuantificados cinco capsaicinoides presentes de forma natural en las especies del género *capsicum*: capsaicina,

dehidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina (Bennet y Kirby, 1968; Masada y *col.*, 1971; Crombie y *col.*, 1955). La Fig. 1 muestra las estructuras de estos compuestos.



**Figura 1.- Estructura química de los capsaicinoides presentes de forma natural en las especies del género *capsicum*.**

De todos ellos, la capsaicina y la dehidrocapsaicina además de poseer una pungencia superior al resto (Todd y *col.*, 1977), contribuyen de una manera más notable en el sabor picante de las especies del género *capsicum* (Iwai y *col.*, 1979) ya que constituyen generalmente el 80-90% del total (Chalchat y *col.*, 1988); también se han identificado otros capsaicinoides pero a niveles traza (Jurenitsch y Leinmuller, 1980).

La sensación de calor y dolor que producen los capsaicinoides en la boca es debida a sus efectos irritantes en las terminaciones nerviosas. Interesa determinar el nivel de este "calor" para su posterior estandarización; además los capsaicinoides son importantes por sus beneficios nutricionales y efectos en el sistema nervioso (Kawada y *col.*, 1985) y por su toxicidad crónica y aguda (López-Carrillo y *col.*, 1994). La capsaicina ejerce su mayor efecto farmacológico en la fibra aferente C de las neuronas sensitivas, produciendo una serie de respuestas que estimulan las fibras sensitivas hasta llegar a la destrucción

---

irreversible de los nervios. Además, los cambios metabólicos inducidos en el grupo 4-hidroxi-3-metoxi benzil de la capsaicina parecen estar implicados en su actividad biológica (Khaled y *col.*, 1993).

En general, el sabor de los pimientos tipo Padrón no es picante, aunque algunos tipos o subtipos contienen niveles altos de capsaicina y dehidrocapsaicina, principales principios picantes de los pimientos, que se forman durante la maduración de los mismos (Iwai y *col.*, 1979).

En la literatura encontramos diversos métodos para el análisis de capsaicinoides; sin embargo, muchos de ellos ya sea porque tienen poca sensibilidad a la hora de resolver mezclas de capsaicinoides (Suzuki y *col.*, 1980; Rymal y *col.*, 1984) o porque requieren un paso previo de derivatización en compuestos más volátiles (Tood y *col.* 1977; Iwai y *col.*, 1979) hacen que sean abandonados y sea la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) la técnica más utilizada para el análisis de capsaicinoides (Cooper y *col.*, 1991; Sakamoto y *col.*, 1994).

### **1.3.5.- VITAMINA C**

El hombre es uno de los pocos animales, incapaz de biosintetizar vitamina C (ácido ascórbico), por lo que debe obtenerla de los alimentos. Esta vitamina es necesaria para la síntesis de colágeno y para la buena formación de huesos, cartílagos y capilares sanguíneos, además de intervenir en el metabolismo de algunos aminoácidos y en la absorción intestinal del hierro. Una deficiencia muy pronunciada en vitamina C, enfermedad conocida como escorbuto, lleva consigo una susceptibilidad muy grande a contraer infecciones (Anderson y *col.*, 1987).

Esta vitamina se encuentra casi exclusivamente en frutas y verduras pero su contenido en un mismo producto depende de una serie de factores como son variedad (Morrison, 1975), tamaño y madurez del fruto (Selman y Rolfe, 1982), tiempo transcurrido entre la recolección y el procesado (Kozar y *col.*, 1988). Todo ello explica la diversidad de los datos existentes en la bibliografía en cuanto al contenido en vitamina C de productos frescos.

La vitamina C es muy soluble en agua (Mueller, 1990) y se oxida con mucha facilidad. La oxidación se ve favorecida por diversos factores tales como calor (LLoyd y *col.*, 1982), daño en la piel del vegetal y presencia de algunos metales como hierro y cobre (Selman y Rolfe, 1982) y pH alcalino (Helsner, 1995). La enzima ascorbato oxidasa que existe en casi todas las hortalizas cataliza la oxidación del ácido ascórbico y es destruida en el escaldado (Primo Yúfera, 1979). Es uno de los nutrientes más lábiles por lo que es usado en los vegetales para determinar la calidad de un alimento (Tijksens y *col.*, 1979).

---

Se han usado numerosos métodos para la determinación de vitamina C, incluyendo espectrofotométricos ( Lage y *col.*, 1980; Ranganna, 1986; Aparicio-Cuesta y García-Moreno, 1988) volumétricos (AOAC, 1990; Garrote y *col.*, 1989), microfluorométricos (AOAC, 1990), polarográficos (Esteve y *col.*, 1995a), voltamétricos (Esteve y *col.*, 1995b), y cromatográficos (Vázquez-Odériz y *col.*, 1994; Baldwin y *col.*, 1995; Thompson and Trenerry, 1995).

### **1.3.6. - ÁCIDOS ORGÁNICOS**

En términos generales, las hortalizas contienen una escasa proporción de ácidos libres, encontrándose la mayoría de ellos en forma de sales, de ahí que su pH oscile entre 5.5 y 7, y son por ello de difícil conservación ( a pH 4.5 se requieren temperaturas de esterilización superiores a 100°C) (Primo Yúfera, 1979).

Los ácidos, además de poseer actividad antimicrobiana ejercen una acción potenciadora del aroma (Picha, 1985; Belitz y Grosch, 1988).

Su contenido va a depender de la variedad (Loiudice y *col.*, 1995), de las condiciones climáticas (Saccani y *col.*, 1995) y del grado de madurez del fruto, disminuyendo su contenido a medida que avanza el proceso de maduración (Primo Yúfera, 1979).

Los ácidos son importantes en relación con el sabor, ya que influyen en la acidez, siendo principalmente responsables de ella los ácidos cítrico y málico (Coultate, 1984), y tienen un efecto indirecto en la percepción del dulzor. Así la relación entre la proporción de azúcares y ácidos orgánicos se considera un índice de madurez del fruto (De La Plaza, 1990; Kuti, 1992).

Los cambios en la composición de ácidos orgánicos se han estudiado en varios frutos durante el crecimiento y desarrollo (Reid y *col.*, 1982), durante el periodo de cosecha (González y *col.*, 1995) y durante el almacenaje a temperatura ambiente (Fuleki y *col.*, 1995). Sin embargo, hay poca información acerca de la influencia que el almacenamiento por congelación o liofilización ejerce en el contenido en ácidos orgánicos.

Actualmente la técnica más empleada para su determinación es por HPLC (Bartolomé y *col.*, 1995; Loiudice y *col.*, 1995), aunque también existen otros métodos tales como: potenciométricos (Gómez Báñez y *col.*, 1987), volumétricos (AOAC, 1990), enzimáticos (Boehringer Mannheim, 1995), de cromatografía de papel (AOAC, 1990) y gas cromatográficos (Okuse y Ryugo, 1981).

---

Los ácidos orgánicos determinados fueron quínico y varios ácidos orgánicos alifáticos generados en el ciclo de Krebs, uno de los procesos fundamentales de la respiración aeróbica.

### **1.3.7.- HIDRATOS DE CARBONO**

Existen tres grupos principales de carbohidratos en los alimentos: *azúcares*, *almidones* y *celulosa* y *sustancias relacionadas*. Todos están constituidos, exclusivamente, por carbono, hidrógeno y oxígeno y sus estructuras químicas están basadas en una unidad común (casi siempre la glucosa). Los azúcares y los almidones son la principal fuente de energía para el hombre en todo el mundo y la celulosa es uno de los principales componentes de la *fibra dietética*.

El estudio de los hidratos de carbono que presenta un vegetal es de suma importancia, ya que excluida el agua, representan el grupo de componentes mayoritario (Primo Yúfera, 1979).

#### **1.3.7.1.- Azúcares**

La glucosa (dextrosa) se encuentra naturalmente en las frutas, en los fluidos vegetales y en la sangre de los animales vivos, y su concentración depende basicamente del grado de madurez del producto. La mayoría de los carbohidratos de los alimentos, quedan reducidos a glucosa durante la digestión.

La Fructosa (levulosa) se presenta naturalmente en algunas frutas, hortalizas y verduras. Es el azúcar más dulce.

Todos los azúcares son solubles en agua y poseen un sabor dulce más o menos marcado. Además de ser una buena fuente de energía, su principal función, contribuyen al metabolismo de las grasas y presentan acción de detoxificación (Anderson y col., 1987).

#### **1.3.7.2.- Almidón**

Polisacárido compuesto por un número variable de unidades de glucosa unidas entre sí formando cadenas lineales o ramificadas (*amilosa* y *amilopectina*, respectivamente). Se encuentra formando gránulos cuya forma y tamaño es característica de la especie vegetal.

---

Los vegetales sintetizan azúcares en sus hojas por acción de la luz solar y los almacenan en los tallos, raíces, tubérculos y semillas en forma de almidón.

Constituye la principal reserva de energía de la mayoría de las plantas, aportando así la mayor parte de la energía consumida por el hombre.

### **1.3.7.3.- Celulosa y sustancias relacionadas: Hemicelulosas y Pectinas**

Este grupo de polisacáridos proporciona la estructura rígida y fibrosa a las verduras, hortalizas, frutas y granos de los cereales, y a la pared de las células que contienen los gránulos de almidón. Son insolubles en agua y constituyen junto con la *lignina* (que no es un carbohidrato) los principales componentes de la *fibra dietética* de la dieta.

La *Celulosa*, que está constituida por numerosas unidades de glucosa, es el compuesto orgánico más abundante de la tierra. El hombre es incapaz de digerirla, ya que es resistente a la hidrólisis por enzimas digestivos del tracto gastrointestinal (Trowell y *col.*, 1976), pero puede ser aprovechada como alimento por los bóvidos y otros mamíferos rumiantes, cuyos aparatos digestivos contienen microorganismos capaces de degradarla hasta glucosa.

Las *hemicelulosas* se encuentran íntimamente asociadas a la celulosa, pectinas y otros polímeros de las paredes de las células vegetales. Son insolubles en agua pero solubles en alcalis. Su estructura química está compuesta por pentosas formando grandes cadenas a través de enlaces glucosídicos  $\beta$ -D-(1  $\rightarrow$ 4). Se conocen tres tipos de hemicelulosas: los xilanos, los mananos y los glucomananos y los galactanos y arabinogalactanos.

La *pectina*, es otro polisacárido complejo, presente en las manzanas y en otras muchas frutas, así como en algunas raíces, como los nabos. No se conoce con certeza su naturaleza, aunque la describen como polímeros lineales de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico unido por enlaces  $\alpha$  1  $\rightarrow$ 4 con una determinada proporción de sus grupos carboxilo esterificados con metanol. No es fibrosa, por lo que es totalmente digerida, teniendo poco efecto sobre el volumen de las heces. No obstante se le considera como parte de la fibra dietética. Destacar su capacidad de formar geles firmes, de vital importancia para la elaboración de mermeladas.

Esta mezcla heterogénea de polisacáridos junto con la lignina constituyen, como ya se mencionó anteriormente, la *fibra dietética* de la dieta, pudiéndose diferenciar entre fibra dietética soluble compuesta fundamentalmente por pectinas y fibra dietética insoluble, que incluye celulosa, hemicelulosa y lignina.

---

Numerosos estudios atribuyen a la fibra una serie de propiedades como son laxante, factor preventivo del cáncer de colon, adsorbente de ácidos biliares, retardador de la absorción intestinal, y factor que favorece la disminución del colesterol y de la glucosa en sangre (Anderson y *col.*, 1987).

Varios estudios han monitorizado los niveles de carbohidratos durante el desarrollo y crecimiento del vegetal (Arribas y *col.*, 1991), durante la madurez (Batisse y *col.*, 1994) y durante la maduración tras la cosecha (Fisher y *col.*, 1994a; Fisher y *col.*, 1994b) o durante el cocinado (Penner y Kim, 1991; Van Den y *col.*, 1986; Vidal-Valverde y Frias, 1991). En contraste, muy pocos estudios han monitorizado los niveles de carbohidratos durante la congelación o la liofilización.

Entre los métodos usados para la determinación de azúcares destacan métodos volumétricos (Ranganna, 1986; AOAC, 1990), enzimáticos/espectrofotométricos (Boehringer-Mannheim, 1995) y cromatográficos, ya sea cromatografía gaseosa (Rahman y Westerlund, 1991; Nahar y *col.*, 1993;) o HPLC, más utilizada ya que la anterior requiere derivatización previa de los azúcares (López-Hernández y *col.*, 1994; Bartolomé y *col.*, 1995; Greenway y Kometa, 1995).

El almidón se ha determinado al igual que los azúcares por métodos volumétricos (AOAC, 1990), enzimáticos/espectrofotométricos (Boehringer-Mannheim, 1995), complejación/espectrofotométricos (Lage y *col.*, 1983), potenciométricos (Birch, 1985), polarimétricos (Moreno Martín y Torre Boronat, 1979) y actualmente se están desarrollando técnicas de HPLC (Sutton y Mouat, 1990; López-Hernández y *col.*, 1994).

Para la determinación de pectinas se han usado métodos espectrofotométricos (Villanueva y *col.*, 1990; Vázquez-Odériz y *col.*, 1992), cromatografía gaseosa (Ha y Thomas, 1988) y HPLC (Vázquez-Blanco y *col.*, 1993; Vázquez-Blanco y *col.*, 1995).

En la determinación de la fibra insoluble se suelen emplear métodos gravimétricos (Halvarson y Alstin, 1984) ya sea mediante el uso de una solución neutrodetergente (Rodríguez y *col.*, 1992; López-Hernández y *col.*, 1996c) o bien de una digestión enzimática (Al-Hasani y *col.*, 1993; Villanueva y *col.*, 1993).

### **1.3.8.- ÁCIDOS GRASOS**

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y los aceites son los más representantes más importantes. Están formados

---

por carbono, oxígeno e hidrógeno y en ciertos casos también pueden contener fósforo y nitrógeno. Todos tienen la particularidad de ser solubles en disolventes orgánicos, e insolubles en agua. Además de su valor nutritivo, los lípidos contribuyen en muchos aspectos a la textura de los alimentos, sirven como vehículo de las vitaminas liposolubles e influyen en el sabor de distintos productos alimenticios (Badui Dergal, 1981; Buss y *col.*, 1987).

Las principales fuentes de aceites y grasas son los tejidos animales y las semillas oleaginosas, ya que los frutos y los vegetales contienen en general muy bajas concentraciones, oscilando normalmente entre 0.1 y 0.3 % (Primo Yúfera, 1979).

Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos. La mayoría son lineales monocarboxilados que varían en el número de átomos de carbono y de dobles enlaces. Normalmente contienen un número par de átomos de carbono. Se dividen en saturados e insaturados, dependiendo de la presencia o ausencia de dobles enlaces en su molécula (Buss y *col.*, 1987).

Los ácidos grasos insaturados, a diferencia de los saturados, son altamente inestables debido a la presencia de dobles enlaces en su molécula, lo que les permite reaccionar con el oxígeno del aire y producir el enranciamiento de la grasa. Este proceso reduce el valor nutricional del alimento y favorece la formación de olores y sabores desagradables. Esta reacción de oxidación es acelerada por el calor, la luz y la presencia de iones metálicos (cobre y hierro principalmente). Así pues, una forma de evitar dicha reacción de oxidación, sería almacenando los alimentos a bajas temperaturas, en la oscuridad y envasados a vacío o en atmósfera inerte.

Otro mecanismo de oxidación es a través de la enzima lipooxigenasa, que realiza una oxigenación en lugar de una oxidación, sobre los ácidos grasos insaturados que contienen como mínimo una unidad de *cis-cis*-1,4-pentadieno. Los ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico son muy susceptibles a esta enzima ya que contienen respectivamente 1 y 2 de estas unidades. Esta enzima, que es muy activa, está presente de forma natural en los tejidos de las plantas.

Hay que destacar la importancia de los ácidos grasos linoleico, linolénico y araquidónico, denominados *ácidos grasos esenciales* ya que no pueden ser sintetizados por el hombre y son necesarios en pequeñas cantidades para mantener la salud. Anteriormente se denominaron "vitamina F" y deben estar presentes en la dieta en cantidad suficiente para aportar el 1-2% de la energía consumida (Buss y *col.*, 1987).

Los ácidos linoleico y linolénico, son necesarios para la síntesis de la prostaglandinas, además de ser parte constitutiva de la membrana de diferentes tejidos vegetales; estos ácidos son también precursores del ácido araquidónico, que se requiere para dar rigidez a la mitocondria de las células. Otras funciones biológicas incluyen la estimulación del crecimiento en el humano, el mantenimiento de la piel y



---

el pelo, la regulación del metabolismo y el colesterol, la actividad lipotrópica y el mantenimiento del sistema reproductivo (Anderson y *col.*, 1987; Buss y *col.*, 1987).

A causa de la importancia de los ácidos grasos en la dieta, se han desarrollado numerosos métodos para su determinación en los alimentos. Así encontramos métodos volumétricos (AACC, 1984), gravimétricos (AOAC, 1990), colorimétricos (Murray y Moss, 1990), espectroscópicos (Lanser y *col.*, 1991) y cromatográficos bien por HPLC (Chaytor, 1987; Senatore, 1990), bien por GC (Bakir y *col.*, 1993; Park y Washington, 1993; López-Hernández y *col.*, 1996d). De todos ellos la Cromatografía gaseosa es la técnica más empleada en la determinación de ácidos grasos.

## **2. OBJETIVOS**

---

Los objetivos marcados en el presente trabajo son:

1.- Determinar la composición química del pimiento tipo Padrón (*Capsicum annuum*, L.), para lo cual, ha sido necesario poner a punto los métodos analíticos de ácidos orgánicos, capsaicinoides y componentes del aroma . El resto de los parámetros se han determinado aplicando métodos analíticos puestos a punto en el Departamento.

2.- Estudiar la evolución de las modificaciones que sufre el pimiento de Padrón en su composición química después de someterle a diferentes procesos de conservación.

La metodología a seguir es la siguiente:

- 1.- Recogida de muestras.
- 2.- Almacenamiento de las muestras mediante diferentes procesos de conservación: congelación normal y a vacío, y liofilización.
- 3.- Extracción y/o separación, teniendo en cuenta la naturaleza de las muestras, realizándose un estudio de las técnicas de extracción más adecuadas para cada uno de los parámetros a analizar.
- 4.- Purificación y concentración, siempre y cuando sea necesario.
- 5.- Análisis de los componentes de interés, una vez extraídos, estableciéndose los eluyentes, columnas cromatográficas y sistemas de detección más idóneos para su correcta separación y cuantificación.
- 6.- Puesta a punto de los métodos, estudiando la precisión, exactitud y recuperación de los mismos.
- 7.- Análisis periódico de las muestras a analizar, previamente congeladas y liofilizadas, una vez seleccionado el método de análisis más adecuado.
- 8.- Tratamiento de datos que permitirá comprobar si hay diferencias significativas para cada parámetro según la procedencia de la muestra, realizándose a continuación un estudio comparativo entre los distintos métodos de conservación a fin de determinar si hay diferencias entre ellos y así poder elegir el más adecuado.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

---

### 3.1.-MUESTREO Y PRESERVACIÓN

Para la realización del presente trabajo, las muestras de pimientos tipo Padrón (*Capsicum annum*, L.) tienen diferente procedencia, según el fin de su utilización. Así hay que diferenciar entre:

1.- Las muestras que han permitido la puesta a punto del método de determinación de ácidos orgánicos, así como determinar su composición química (humedad, hidratos de carbono, fibra, ácidos orgánicos y pigmentos) procedentes de los supermercados de la ciudad.

2.- Las muestras que han permitido por un lado la puesta a punto del método de determinación de capsaicinoides y la evolución de los mismos durante la cosecha, y por otro lado, la puesta a punto del método de determinación de los componentes responsables de su aroma y el estudio de las modificaciones sufridas un mes después de someterle a los procesos de congelación, con y sin vacío, y de liofilización, en este caso procedentes de la finca de la Doctora Julia López Hernández, situada en Bugallido (Ames).

3.- Las muestras que han permitido estudiar las modificaciones de su composición química (humedad, hidratos de carbono, fibra, ácidos orgánicos y pigmentos) después de someterle a diferentes procesos de conservación (congelación normal y a vacío, y liofilización), en esta ocasión suministradas por el Servicio de Extensión Agraria de Padrón y Vilagarcía en la primavera del 1994.

Para este último estudio, el mismo día de la recolección de las muestras y una vez en el laboratorio, se sometieron a un análisis en fresco para determinar la composición inicial de los parámetros de interés, referencia necesaria en este estudio.

Antes de su procesado, se procedió a la eliminación del pedúnculo. Seguidamente fueron divididos en treinta porciones de 200g cada una y se procedió de la siguiente manera:

a) Diez porciones de pimientos fueron secadas mediante liofilización (Liolabore 3 Telstar; 0.01mm de Hg durante 2 días; temperaturas de -40°C a +30°C) y luego almacenados a temperatura ambiente en frascos de cristal libres de aire y guardados en la oscuridad.

b) Diez porciones de pimientos fueron empaquetadas en bolsas de polietileno expulsando manualmente el aire en la medida de lo posible y luego almacenados en un arcón congelador a -22°C.

c) Diez porciones de pimientos fueron empaquetadas a vacío (Henkovac 1900; 40 mm Hg durante 16 seg) en bolsas de polietileno y luego almacenados en un arcón congelador a -22°C.

Para los análisis se tomaron muestras periódicas a los 1, 2, 3, 5, 7, 9 y 12 meses de almacenamiento.

---

### **3.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS**

#### **3.2.1.- DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD**

La técnica utilizada para determinar la humedad ha sido la liofilización.

##### **3.2.1.1.- Material y aparatos**

- Recipientes de aluminio ( $22 \times 14 \times 3$  cm)
- Arcón congelador Edesa de 1000 litros de capacidad.
- Liofilizador LIOLABORE 3 TELSTAR.

##### **3.2.1.2.- Preparación de la muestra**

Una vez homogeneizada la muestra, se coloca en recipientes de aluminio previamente tarados ( $P_1$ ) con sus tapas correspondientes y se pesan ( $P_2$ ), realizando a continuación el proceso de liofilización propiamente dicho (0.01mm de Hg durante 2 días; temperaturas de  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $+30^{\circ}\text{C}$ ). Una vez finalizado, se pesan de nuevo los recipientes, con sus tapas ( $P_3$ ). Por diferencia de peso antes y después de la liofilización se conoce la pérdida de agua.

##### **3.2.1.3.- Cálculos**

$$\% \text{ de humedad} = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

$P_1$  = Peso del recipiente vacío.

$P_2$  = Peso del recipiente con la muestra fresca.

$P_3$  = Peso del recipiente con la muestra liofilizada.

---

### 3.2.2. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS

Este análisis se ha llevado a cabo mediante el método de López-Hernández y *col.*, 1993, puesto a punto en nuestro Departamento.

Los RSD del método, obtenidos sometiendo 10 porciones de la misma muestra al proceso completo de análisis, fueron de 2.45, 3.30, 3.27 y 2.32 para la luteína, clorofila *b*, clorofila *a* y  $\beta$ -caroteno, respectivamente.

#### 3.2.2.1.- Reactivos

- Patrones de los pigmentos:
  - Clorofila *a*. SIGMA Art. C-5753.
  - Clorofila *b*. SIGMA Art. C-5878.
  - All-trans*-luteína. SIGMA Art. X-6250.
  - All-trans*- $\beta$ -caroteno. SIGMA Art. C-9750.
- Solventes de Grado para HPLC:
  - Metanol. SCHARLAU Art. Me-306.
  - Acetonitrilo. SCHARLAU Art. Ac-329.
  - Diclorometano. SCHARLAU Art. Cl-335.
  - Hexano. SCHARLAU Art. He-231.
- Solventes de grado para análisis:
  - Acetona SCHARLAU Art. Nv-011.
  - Eter de petróleo SCHARLAU Art. Nv-140.
- Reactivos de grado para análisis:
  - Arena de mar lavada. PANREAC Art. 211160.
  - Carbonato cálcico. MERCK Art. 2066.
  - Sulfato sódico anhidro. PROBUS Art. 175120.

#### 3.2.2.2.- Material y aparatos

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800 y bucle de inyección de 20  $\mu$ L, Rheodyne.
- Detector UV-VIS Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Spherisorb ODS2 (C18) de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m, con precolumna Adsorbosphere C18 (5  $\mu$ m, 20 x 4.6 mm).
- Ordenador 386 IBM con 4 MB de memoria RAM, con el sistema operativo "Operating System/2" versión 1.2
- Software FOCUS de Spectra-Physics versión 1.3 para la adquisición y tratamiento de los datos.

---

-Harvard Graphics, versión 3.0 para realizar las figuras.

### 3.2.2.3.- Preparación de la muestra

Se pesan 10 g de muestra (1 g en el caso de muestra liofilizada), se le añade 1 g de carbonato cálcico, se desintegra el tejido añadiendo arena de mar y 20 g de sulfato sódico anhidrido; a continuación se añaden pequeñas porciones de una mezcla acetona: éter de petróleo (1:1) filtrando de cada vez a vacío hasta que no quede color en el residuo, se juntan todos los filtrados llevándolos a un volumen total de 100 mL. Del extracto resultante se toma una alícuota de 10 mL y se evapora bajo corriente de nitrógeno en un baño de agua a 37 °C hasta obtener un residuo seco que se redisuelve en 2 mL de hexano, se filtra a través de un filtro Millipore de 0.45 µm para eliminar las partículas no solubles y se inyecta en el cromatógrafo.

### 3.2.2.4.- Preparación de los patrones

Se prepara una solución madre de pigmentos en 10 mL de acetona. De aquí se toman las porciones necesarias para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de los pigmentos en la muestra queden en el rango de la escala establecida. La acetona se evapora bajo corriente de nitrógeno y se redisuelven las porciones en hexano, para luego ser inyectadas en el cromatógrafo.

### 3.2.2.5.- Procedimiento cromatográfico

El eluyente utilizado para llevar a cabo la separación analítica se compone de una mezcla de metanol, acetonitrilo y diclorometano/hexano 1:1, con una composición inicial que se mantiene durante los 9 primeros minutos, para luego comenzar un gradiente que termina a los 16 minutos (ver Tabla II). El flujo es constante (0.8 mL/min). Al final de cada inyección la columna es reequilibrada con la mezcla inicial isocrática durante 20 minutos a un flujo de 2 mL/min.

**Tabla II.- Programa de gradiente empleado para la separación de los pigmentos.**

Tiempo (min)	Flujo mL/min	Metanol	Diclorometano- Hexano	Acetonitrilo
0	0.8	15	75	10
9.0	0.8	15	75	10
16.0	0.8	15	40	45
24.0	0.8	15	40	45
24.0	2.0	15	75	10
44.0	2.0	15	75	10

La absorción visible de los mismos se mide en modo “full scan” siendo tres las longitudes de ondas seleccionadas en función de los máximos de absorbancia de los espectros registrados de cada componente.



---

### 3.2.2.6.- Identificación y cuantificación

La identificación de los pigmentos de las muestras se basa en la comparación de sus tiempos de retención y espectros visibles, registrados con el Sistema Spectra Focus, con los de los patrones correspondientes. Las longitudes de onda seleccionadas para la cuantificación fueron: 430nm para la clorofila *a*, 450 nm para la luteína y el  $\beta$ -caroteno y 460 nm para la clorofila *b*.

### 3.2.2.7.- Cálculos

Para la cuantificación de los pigmentos, se establece una recta de calibrado en función de la relación de las áreas de los picos con las concentraciones de los correspondientes patrones.

## 3.2.3.- DETERMINACIÓN DE COMPUESTO AROMÁTICOS

### 3.2.3.1.- Material y aparatos

- Dispositivo de purga térmica CL/Purgue-1 (CROMLAB)
- Unidad Impingeer TOURÓN (ref. Q.1223/1 y Q.1223/2)
- Baño de agua Tectrón 3473100
- Desorbedor térmico Rektorik, MW-1A
- Cromatógrafo de gases GC 8000 series (Fisons Instruments)
- Espectrómetro de Masas MD 800 (Fisons Instruments)
- Cartuchos de adsorción: cartucho R-010R (carbón grafitizado)  
cartucho R-010B (carbón activo)
- Columna capilar: DB-5, 30 m x 0.25 mm ID (J&W Scientific).
- Gas portador Helio N-50
- Nitrógeno N-50
- Ordenador Dell 486X, con 8 MB de memoria RAM y con coprocesador

matemático, con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2, en el entorno Windows 3.11 para trabajo en grupo.

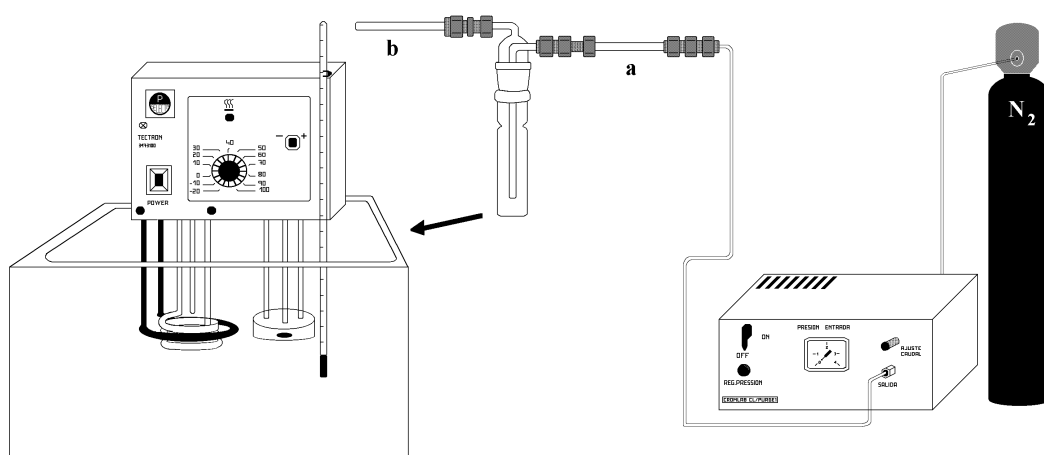
- Ordenador HP VECTRA VE (Pentium), con 8 MB de memoria RAM y con coprocesador matemático 486DX, con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2, en el entorno Windows 3.11 para trabajo en grupo.

- Software de adquisición de datos (MS) MASSLAB versión 1.2
- Biblioteca de espectros Wiley.
- SPSS para Windows para el tratamiento estadístico de los datos.

### 3.2.3.2.- Preparación de la muestra

Antes de comenzar el análisis propiamente dicho, los cartuchos de adsorción se someten al mismo proceso al que más tarde será sometida la muestra con el fin de comprobar la ausencia de picos interferentes.

A continuación, la muestra (15g pimiento entero, 2g pimiento triturado y 0.2 g muestra liofilizada) es colocada en el dispositivo de purga térmica (ver Fig. 2), donde se le hace llegar una corriente de Nitrógeno que arrastrará los volátiles, los cuales quedarán atrapados en el cartucho de adsorción. La corriente de Nitrógeno antes de llegar al seno de la muestra pasa a través de un cartucho R-010B, cuya misión es retener los posibles compuestos derivados de la línea de conducción del Nitrógeno. La recolección de los volátiles se realiza en la cámara de purga, previamente calentada a 40°C, durante 1 hora y con un flujo de N<sub>2</sub> regulado a 60 mL/min. Una vez transcurrido este tiempo se retira el cartucho y se cierran ambos extremos hasta el momento de su análisis.

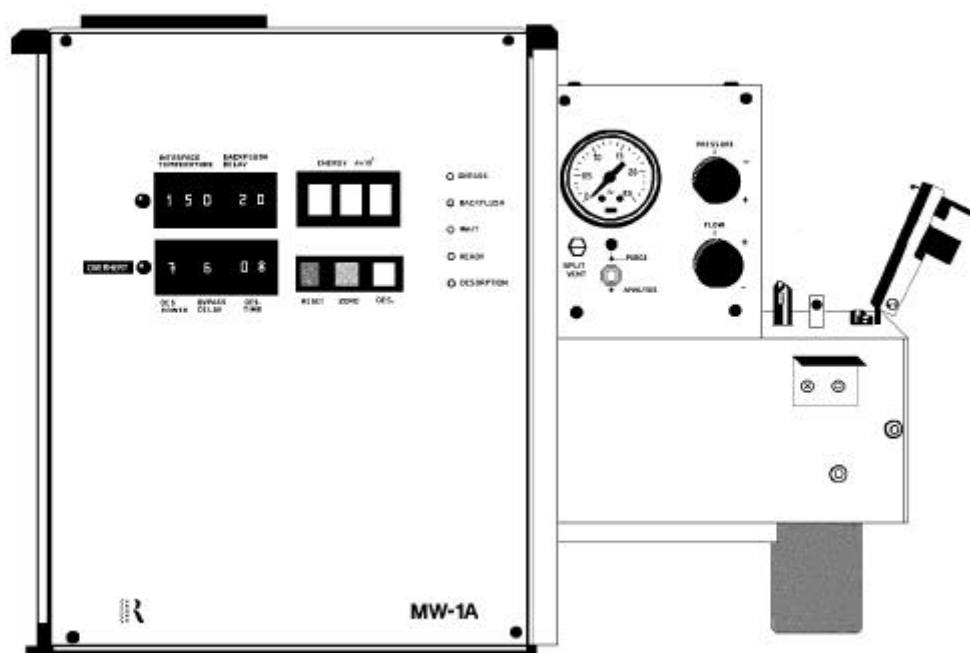


a) Cartucho R-010B

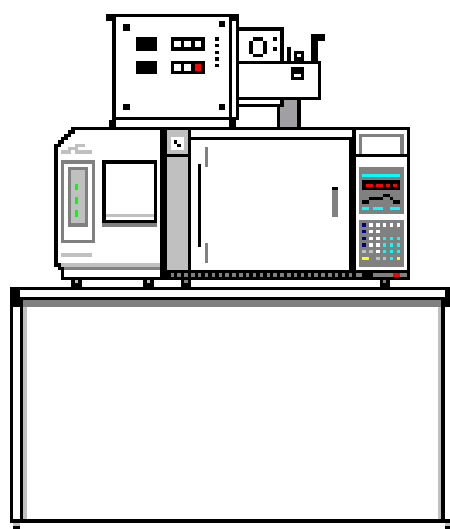
b) Cartucho R-010R

**Figura 2.- Dispositivo de purga térmica.**

La desorción del cartucho se realiza directamente desde el desorbedor térmico Rektorik MW-1A (ver Fig. 3), a la columna capilar en el cromatógrafo de gases, mediante microondas guiadas (ver Fig. 4).



**Figura 3.- Desorbedor térmico Rektorik MW1A.**



**Figura 4.- Desorbedor-GC-MS**

Finalmente, el cartucho se somete a una segunda desorción con el fin de asegurar que la desorción de los volátiles ha sido completa.

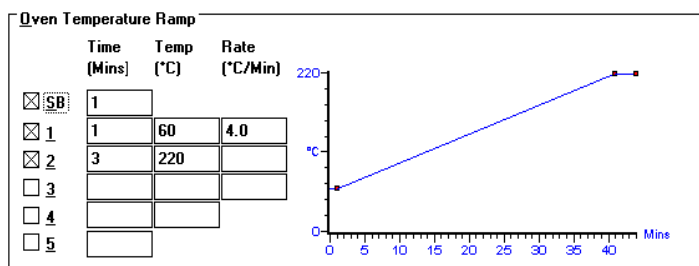
### 3.2.3.3.- Condiciones de trabajo

#### 3.2.3.3.1.- Condiciones de la desorción térmica

- Temperatura de la “interface”: 150 °C
- “Backflush delay”: 20 s
- “Desorption Power”: 7
- “Bypass Delay”: 6 s
- “Desorption time”: 0.8 s

#### 3.2.3.3.2.- Condiciones del cromatógrafo de gases

- Gas portador: Helio N-50
- Presión en cabeza de columna 0.8 Bar.
- Flujo del gas portador: 2.43 mL/min.
- Relación split: 1:10
- Temperatura de la “interface”: 250°C
- Programa de temperatura:



#### 3.2.3.3.3.- Condiciones del espectrómetro de masas:

- Temperatura de la fuente: 200°C
- Voltaje relativo del multiplicador de electrones: 70 eV
- Temperatura del detector: 230°C
- Análisis: en modo SCAN:
  - \* Rango de masas: 35.00 - 200.00 [ EI+ ]
  - \* Tiempo de equilibrio: 1 min
  - \* Duración del análisis: 45 min

---

#### 3.2.3.4.- Identificación

La identificación de los volátiles se basa en la comparación de los espectros de masas con los de la biblioteca de espectros Wiley.

#### 3.2.4. DETERMINACIÓN DE CAPSAICINOIDES.

Para la determinación de estos capsaicinoides se ha desarrollado un método de HPLC con detector UV puesto a punto en este trabajo y que ha sido objeto de una publicación en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (López-Hernández y col., 1996 b).

##### 3.2.4.1. - PROCEDIMIENTO

###### 3.2.4.1.1.- Reactivos

- Patrón de Capsaicina: FLUKA ref. 21750.
- Agua de grado HPLC, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-RO, MILLI-Q, MILLIPORE.
- Solventes de grado para HPLC: Metanol. SCHARLAU. Me 306.
- Solventes de grado para análisis: Acetona SCHARLAU. Nv 011.

###### 3.2.4.1.2.- Material y aparatos

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800 y bucle de inyección de 20µL, Rheodyne.
- Detector UV-VIS Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Spherisorb C<sub>8</sub> de 250 × 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5µm.
- Ordenador 386 IBM con 4 MB de memoria RAM, con el sistema operativo "Operating System/2" versión 1.2
- Software FOCUS de Spectra-Physics versión 1.3 para la adquisición y tratamiento de los datos.

###### 3.2.4.1.3.- Preparación de la muestra

Se pesan 20 g de muestra, una vez eliminado el pedúnculo y las semillas, y se pone a reflujo durante 1 hora con 50 mL de acetona. A continuación este extracto se filtra a vacío ajustándose a un volumen final de 50 mL. Una alícuota de 1 mL de esta solución se diluye a 5 mL con metanol:agua (65:35). Finalmente una alícuota de esta solución resultante se filtra a través de una membrana filtrante de 0.45µm, para luego ser inyectada en el cromatógrafo.

---

#### **3.2.4.1.4.- Preparación del patrón**

Se prepara una solución madre de capsaicinoides en 100 mL de acetona. De aquí se toman las porciones necesarias para establecer una escala, de tal forma que las concentraciones de los capsaicinoides en la muestra queden en el rango de la escala establecida.

#### **3.2.4.1.5.- Condiciones de trabajo**

- Fase móvil: Metanol:agua (65:35)
- Flujo: 1 mL/min.
- Detección: 280 nm.

#### **3.2.4.1.6.- Identificación y cuantificación**

La identificación de los capsaicinoides de las muestras se basa en la comparación de sus tiempos de retención y espectros ultravioletas, registrados con el Sistema Spectra Focus, con los de los patrones correspondientes. La longitud de onda seleccionada para la cuantificación fue 280 nm.

#### **3.2.4.1.7.- Cálculos**

Se establece una recta de calibrado calculándose a partir de la misma la concentración de cada capsaicinoide en la muestra.

### **3.2.5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINA C**

Esta determinación se ha llevado a cabo siguiendo el método de HPLC de Vázquez-Odériz y *col.*, 1994, puesto a punto en nuestro departamento, con una pequeña modificación de la fase móvil.

#### **3.2.5.1.- PROCEDIMIENTO**

##### **3.2.5.1.1.- Reactivos**

- Patrones de ácidos orgánicos:
  - Acido L-málico. SIGMA Art. M-1000
  - Acido cítrico. MERCK Art. 241.
  - Acido oxálico. PANREAC Art. 131041
  - Acido fumárico. SIGMA Art. F-2752
  - Acido quínico. SIGMA Art. Q-0500.
- Patrón de vitamina C: -L(+) ácido ascórbico. MERCK. Art. 127
- Agua de grado HPLC, obtenida por ósmosis en un equipo MILLI-RO, MILLI-Q, MILLIPORE.
- Solventes de grado para análisis: -Acido meta-fosfórico. MERCK Art. 546.

---

#### **3.2.5.1.2.- Material y aparatos**

- Cromatógrafo de líquidos Spectra-Physics, equipado con una bomba SP8800 y bucle de inyección de 20  $\mu$ L, Rheodyne.
- Detector UV-VIS Spectra Focus Forward Optical Scanning.
- Columna Tracer (C<sub>18</sub>) de 250 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m, con precolumna Adsorbosphere C18 (5  $\mu$ m, 20 x 4.6 mm).
- Agitador rotativo ATOM-80.
- Ordenador 386 IBM con 4 MB de memoria RAM, con el sistema operativo “Operating System/2” versión 1.2
- Ordenador HP VECTRA VE (Pentium), con 8 MB de memoria RAM y con coprocesador matemático 486DX, con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2, en el entorno Windows 3.11 para trabajo en grupo.
- Software FOCUS de Spectra-Physics versión 1.3 para la adquisición y tratamiento de los datos.
- Harvard Graphics, versión 3.0 para realizar las figuras.

#### **3.2.5.1.3.- Preparación de la muestra**

Se pesan 20 g de muestra (2 g en el caso de muestra liofilizada), se añaden 60 mL de una solución de ácido meta-fosfórico al 4.5% (p/v), se mantiene en agitación mecánica durante 15 minutos, se filtra a vacío a través de papel (Whatman nº 541), se lava el residuo con una pequeña porción del solvente indicado y se enrasa a 100 mL con agua destilada. Una alícuota de la solución resultante se pasa a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m, y se inyecta en el cromatógrafo.

#### **3.2.5.1.4.- Preparación del patrón**

Se prepara una solución madre de ácidos orgánicos y vitamina C en 50 mL de la solución de ácido meta-fosfórico (4.5%) y de aquí se toma las cantidades necesarias para establecer una escala de soluciones patrón, de tal forma que la concentración de ácidos y vitamina C presentes en la muestra queden dentro del rango establecido.

#### **3.2.5.1.5.- Condiciones de trabajo**

- Fase móvil: agua de grado HPLC llevada a pH 2.2 con ácido metafosfórico.
- Flujo: 0.5 mL/min.
- Detección: 245 nm para la vitamina C y el ácido oxálico, y 215 nm para los demás ácidos orgánicos.

---

### **3.2.5.1.6.- Cálculos**

Se establece para cada una de las sustancias su recta de calibrado, calculando a partir de la misma la concentración de cada componente en la muestra.

### **3.2.6.- DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO**

La determinación de azúcares y almidón se ha llevado a cabo mediante el método de López-Hernández y *col.*, 1994, las pectinas se han determinado siguiendo el método de Vázquez-Blanco y *col.*, 1995 y para la fibra insoluble se ha seguido el método de López-Hernández y *col.*, 1996 c, todos ellos puestos a punto en nuestro Departamento.

El RSD del método seguido para la determinación de azúcares y almidón, obtenido sometiendo 10 porciones de la misma muestra al proceso completo de análisis, fue de 2.77, 1.55 y 2.05 para la fructosa, glucosa y almidón, respectivamente. Así mismo, el RSD del método seguido para la determinación de las pectinas y fibra insoluble fue de 0.55 y 1.38, respectivamente.

#### **3.2.6.1.- DETERMINACIÓN DE AZÚCARES, ALMIDÓN Y PECTINA.**

##### **3.2.6.1.1.- Reactivos**

-Patrones de azúcares:

-Fructosa. MERCK Art. 5323

-Glucosa. MERCK Art. 8337

-Acido galacturónico. SIGMA Art. G-2125

-Solventes de grado para HPLC:

-Acetonitrilo. SCHARLAU Art. 263092

-Agua ultrapura MILI-Q

-Acido glacial acético. SCHARLAU Art. Ac-344.

-Solventes de grado para análisis:

-Etanol. SCHARLAU Art. Nv-120

-Reactivos de grado para análisis:

-Acido cítrico. MERCK Art.244

-Hidrógeno fosfato de sodio. SIGMA Art. S-0876

-Hidróxido sódico 0.1N. PANREAC Art. 141687

-Acetato de sodio. MERCK Art. 6267



---

-Enzima amiloglucosidasa (E.C.3.2.1.3) from *Aspergillus niger*. BOEHRINGER-MANHEIM Art. 208469.

-Enzima pectinasa (EC 3.2.1.15) from *Aspergillus niger*. SIGMA Art. P-9932

-Enzima celulasa (EC 3.2.1.4) from *Penicillium funiculosum*.

SIGMA Art. C-9750.

### **3.2.6.1.2.- Material y aparatos**

- Bomba Spectra Physics 8700 XR, bucle de inyección de 20 µL Rheodyne.

- Detector de Índice de Refracción Shodex RI-71.

- Columna Spherisorb NH<sub>2</sub> de 5 µm y 250 x 4.6 mm.

- Calentador de columna Spectra-Physics SP 8792.

- Estufa de incubación.

- Agitador rotativo ATOM-80

- Refrigerante a reflujo.

- Placa calefactora.

- Integrador Spectra Physics 4290 comunicado vía Labnet a un ordenador personal TANDY 1000L equipado con los programas DOUBLE DOS y WINner para tratamiento de datos, con el sistema operativo MS-DOS ver. 3.2

- Ordenador HP VECTRA VE (Pentium), con 8 MB de memoria RAM y con coprocesador matemático 486DX, con el sistema operativo MS-DOS versión 6.2, en el entorno Windows 3.11 para trabajo en grupo.

-Harvard Graphics, versión 3.0 para realizar las figuras.

### **3.2.6.1.3.- Preparación de la muestra**

Se pesan 30 g de muestra (3 g en el caso de muestra liofilizada) y se pone a reflujo durante 45 min. con 160 mL de alcohol del 80% (v/v). A continuación este extracto se filtra a vacío y se lava con un pequeño volumen de alcohol caliente. El residuo obtenido se seca en una estufa a 37 °C durante 12 h., obteniéndose el material insoluble en alcohol (AIS) que se utilizará para la determinación posterior del almidón y las pectinas y la solución obtenida, que contiene los azúcares simples, se lleva a un volumen de 200 mL. Una alícuota de 5 mL de esta solución se purifican mediante una extracción en fase sólida con una SEP-PAK C18. La porción resultante se pasa a través de una membrana filtrante de 0.45 µm para luego ser inyectada en el cromatógrafo.

Para la determinación del almidón, se pesan 700 mg de AIS en un erlenmeyer, se añaden 40 mL de agua y se hierve a reflujo durante 2 h. para gelatinizar el almidón. Al cabo de este tiempo se para la ebullición, se deja enfriar a 40°C, se adicionan 40 mL de solución tampón citrato/fosfato (pH=4.6) y 20 mg (120 unidades) de amiloglucosidasa, se tapa el erlenmeyer con papel de aluminio y se incuba durante 16 h. a 55-58°C para hidrolizar el almidón a glucosa. Para la determinación de pectinas a 300 mg de

---

(MIA) se le añaden 30 mL de agua destilada y 1 mL de hidróxido sódico 0.1 N (pH 9.5), se agita vigorosamente y se incuba durante 20 h a 4°C. Transcurrido este tiempo se ajusta el pH a 4.5 con ácido acético glacial diluído, se añaden 60 mg (400 unidades) de celulasa y 1 mL de pectinasa (64 unidades) y se incuba durante 20 h. a 55°C, para hidrolizar la pectina a ácido galacturónico. Estas mezclas se enfrían y se enrasan con 100 y 50 mL de agua el almidón y la pectina respectivamente. A continuación se filtra una alícuota a través de papel (Whatman n° 541), y las soluciones resultantes se filtran de nuevo a través de una membrana filtrante de 0.45 µm, para luego ser inyectada en el cromatógrafo.

#### **3.2.6.1.4.- Preparación de los patrones**

Se prepara una solución madre de los azúcares en alcohol del 80% y de aquí se toman las porciones necesarias para confeccionar una escala, de tal manera que la concentración de los azúcares presentes en la muestra quede en el rango de la escala establecida.

Se prepara una escala con el patrón de glucosa disuelto en agua de tal modo que la concentración de glucosa, obtenida por hidrólisis del almidón presente en la muestra, quede dentro del rango de la escala establecida.

Se prepara una solución madre de ácido galacturónico en agua y se confecciona una escala de tal manera que la concentración de ácido galacturónico, obtenido por hidrólisis de la pectina presente en la muestra, quede dentro del rango de la escala establecida.

#### **3.2.6.1.5.- Condiciones de trabajo**

Azúcares y almidón:

- Fase móvil: acetonitrilo: agua (90:10)
- Flujo: 1.4 mL/min
- Columna Spherisorb NH<sub>2</sub> de 5 µm y 250 x 4.6 mm, termostatzada a 28°C
- Detección: Índice de Refracción

Pectinas:

- Fase móvil: Acetato de Sodio 0.1M llevado a pH 4.6 con ácido glacial acético.
- Columna Spherisorb NH<sub>2</sub> de 5 µm y 250 x 4.6 mm.
- Flujo: 0.8 mL/min.
- Detección: Índice de Refracción

#### **3.2.6.1.6.- Cálculos.**

Con la escala de patrones se establece una recta de calibrado a partir de la cual se calcula la concentración de las sustancias en la muestra.

### 3.2.6.2.- FIBRA INSOLUBLE

#### 3.2.6.2.1.- Reactivos

- Solución acuosa neutrodetergente formada por:
  - Acido etilendiamin-tetracético (EDTA). SCHARLAU Art. Ac-940
  - Borato de sodio decahidratado (BORAX). SIGMA Art. S-9640
  - Dodecyl sulfato sódico. MERCK Art. 13760
  - 2-etoxietanol. SCHARLAU Art. Et-182
  - Hidrógeno fosfato de sodio anhidro. SIGMA Art. S-0876
- Sulfato sódico anhidro. PANREAC Art. 131716
- n-Octanol. MERCK Art. 991
- Acetona. NORMASOLV Art. Nv-010

#### 3.2.6.2.2.- Material y aparatos

- Unidad de extracción "Dosi-Fiber" (ver Fig. 5)
- Crisoles con filtro de porosidad nº 2 (40-70  $\mu\text{m}$ )
- Estufa
- Horno

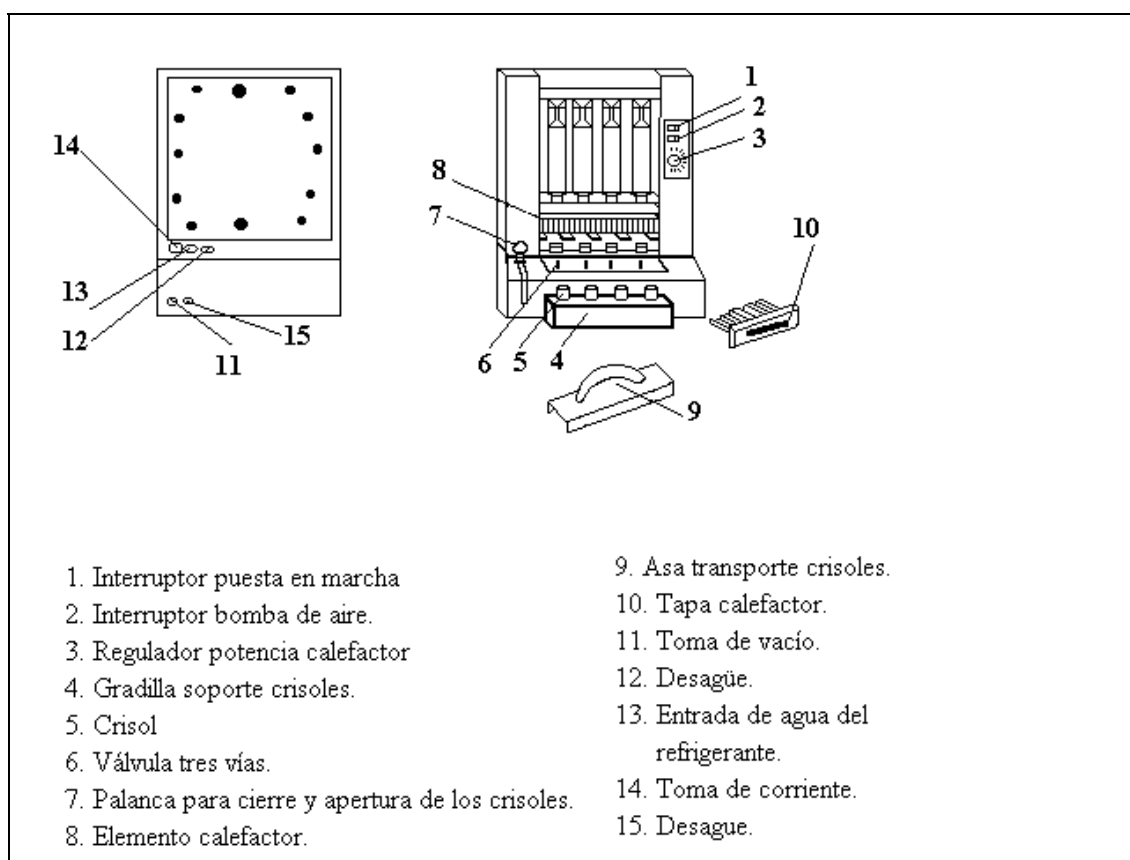


Figura 5.- Unidad de extracción "Dosi-Fiber".

---

#### **3.2.6.2.3.- Procedimiento**

Para la determinación de la fibra insoluble se pesa 1 g de muestra seca en los crisoles y se lleva a la unidad de extracción. A continuación se añaden 100 mL de solución neutrodetergente, previamente calentada a 95-100°C, una punta de espátula de sulfato sódico anhidro y 2-3 gotas de n-octanol. Se enciende el calefactor hasta 80-90°C y se extrae durante 1 h. Al finalizar el tiempo de extracción se abre el grifo de la trompa de agua y se aspira. Seguidamente se lavan las paredes con agua caliente y con acetona.

Una vez completada la filtración se sacan los crisoles de la unidad de extracción y se llevan a una estufa a 100°C durante 8 h. para secar el residuo. Al cabo de este tiempo se lleva a un desecador a temperatura ambiente durante 45 min. y se pesa. Este residuo está constituido por celulosa, hemicelulosa, lignina, cutina, silica y cenizas insolubles. Para descartar estas cenizas insolubles se incinera el residuo durante 3 h. a 550°C, se lleva a un desecador y se pesan. De la diferencia de ambas pesadas se calcula la cantidad de fibra presente en las muestras.

#### **3.2.6.2.4.- Cálculos**

Para calcular la cantidad de fibra de la muestra se sigue la fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = A - B / C \times 100$$

donde:

- A: Peso de la muestra desecada (fibra + cenizas insolubles)
- B: Peso de la muestra incinerada (cenizas insolubles)
- C: Peso de la muestra

#### **3.2.7.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

La determinación de los ácidos grasos se ha realizado siguiendo el método de López Hernández y col., 1996 d, puesto a punto en nuestro Departamento. Este método se basa en la separación y determinación por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Los RSD del método, obtenidos sometiendo 10 porciones de la misma muestra al proceso completo de análisis, fueron de 1.30, 1.60, 2.07, 0.93, 2.10 y 3.61 para los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquídico, respectivamente.

### 3.2.7.1.- Reactivos

- Patrones de ácidos grasos:
  - Mirístico. SIGMA Art. M-3128
  - Palmítico. SIGMA Art. P-5917
  - SIGMA Art. H-4515 (patrón interno)
  - Esteárico. SIGMA Art. S-4751
  - Oleico. SIGMA Art. O-3879
  - Linoleico. SIGMA Art. L-1376
  - SIGMA Art. L-2376
  - A-3631
  - MERCK Art. 4371
- Heptadecanico.
- 
- Linolénico.
- Araquídico. SIGMA Art.
- Solventes para análisis de trazas: n-Hexano.
- Reactivos de grado para análisis:
  - Metanol. SCHARLAU Art. Me 306
  - Acido sulfúrico. NORMASOLV Art. Nv 037

### 3.2.7.2.- Material y aparatos

- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer 8700, equipado con inyector split-splitless, con software para adquisición y tratamiento de datos, y con detector de ionización de llama (FID).
- Columna capilar SGL-1000 de 25 m x 0.25 mm y 0.25µm y temperatura máxima de 240°C
- Impresora EPSON LX-800, conectada directamente a la puerta en serie del GC.
- Gas portador N-50
- Hidrógeno N-50
- Aire comprimido. Compresor Ingersoll-Rand 270627

### 3.2.7.3.- Extracción de los lípidos

Para el análisis, 2 g de muestra liofilizada se someten a una extracción continua en el soxhlet con hexano durante 4 h (Spitzer y *col.*, 1991; Ajewole y Adeyeye, 1993). Transcurrido este tiempo se evapora el hexano con precaución y las últimas trazas del solvente son eliminadas bajo una corriente de nitrógeno.

### 3.2.7.4.- Preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos

La obtención de los ésteres metílicos se lleva a cabo utilizando el extracto obtenido en el apartado anterior con metanol sulfúrico al 1.5% durante 30 min. Transcurrido este tiempo los ésteres metílicos se extraen con 50 mL de hexano en 3 etapas (20+20+10) y 5 mL de este extracto son evaporados a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. El residuo obtenido se redisuelve en 1 mL de hexano y se filtra a través de una membrana filtrante de 0.45 µm, se sobrecarga con una cantidad conocida de estándar interno y se inyecta en el cromatógrafo.

---

### **3.2.7.5.- Preparación de los patrones**

Se prepara una solución madre de ácidos grasos, se someten al proceso de metilación y se toman las porciones necesarias para confeccionar una escala de tal manera que la concentración de los ácidos grasos presentes en la muestra quede en el rango de la escala establecida.

### **3.2.7.6.- Condiciones de trabajo**

-Temperatura del inyector: 230°C.

-Temperatura del detector: 230°C.

-

Temperatura de la columna programada de 100 a 230°C.

-Cantidad de muestra inyectada: 1 µL

-Flujo

del gas portador: 0.81 mL/min.

-Relación de split: 1:37

-Técnica de la inyección: La inyección se realiza con una temperatura de la columna de 100°C, manteniéndose de forma automática la válvula del divisor de muestra cerrada. Transcurrido el primer minuto se abre automáticamente dicha válvula al mismo tiempo que empieza la temperatura programada con un gradiente de 18°C/min hasta alcanzar una temperatura de 160°C, transcurrido lo cual continúa una nueva rampa con un gradiente de 1.5°C/min hasta 210°C.

### **3.2.7.7.- Identificación y cuantificación**

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención corregidos (RRT) con los correspondientes a los estándares. La cuantificación se realizó usando el éster metílico del ácido heptadecanoico (C17:0) como estandar interno.

## **4. RESULTADOS Y DISCURSIÓN**

---

#### **4.1. - PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.**

##### **4.1.1. - DETERMINACIÓN DE CAPSAICINOIDES.**

Los niveles de capsaicinoides son realmente bajos o inexistentes al comienzo de este muestreo, por ello fue necesario poner a punto el método con variedades de pimienta de cayena comerciales (López-Hernández y *col.*, 1996b).

En el desarrollo del método se intentó aprovechar la solución resultante de la extracción del color formada por una mezcla de acetona:éter de petróleo (1:1), en la cual los capsaicinoides serían solubles, pero el cromatograma que se obtenía, apenas se identificaba ya que interferían otras sustancias presentes en este extracto. Se optó por purificar dicha solución con una minicolumna de alúmina pero los resultados seguían siendo no satisfactorios.

La longitud de onda seleccionada para la medida fue de 280 nm. A esta longitud de onda los límites de detección siguiendo las normas ACS (1980) fueron de 0.89 y 0.57 µg/mL para la capsaicina y dehidrocapsaicina, respectivamente. A 200 nm si bien los límites de detección para ambos capsaicinoides eran más bajos (0.35 y 0.51 µg/mL para la capsaicina y dehidrocapsaicina respectivamente), pero se hacía más difícil su cuantificación ya que el cromatograma salía más sucio.

Para la determinación de la precisión de la medida, una misma solución se inyectó seis veces. Los RSD fueron 1.38 para la capsaicina y 0.95 para la dehidrocapsaicina.

Para la determinación de la precisión del método, una misma muestra fue sometida 10 veces al proceso completo de análisis, obteniéndose unos RSD de 2.33 y 1.02 para la capsaicina y la dehidrocapsaicina, respectivamente.

Para evaluar la recuperación del método se sobrecargaron 10 muestras con soluciones estándar de concentraciones conocidas. La media de estas recuperaciones fue de 97.4% con un RSD de 3.05%.

El método fue calibrado usando los patrones de ambos capsaicinoides. La regresión lineal del área de cada pico (y) en la concentración del estándar (x) dieron las siguientes ecuaciones: para la capsaicina  $y = -2493 + 331924 x$ , con un coeficiente de correlación  $r=0.9998$  y para la dehidrocapsaicina  $y = -5296 + 235232 x$ , con un coeficiente de correlación de  $r=0.9997$ .



---

#### 4.1.2.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINA C

Esta determinación se ha llevado a cabo siguiendo el método de HPLC de Vázquez-Odériz y col., 1993, puesto a punto en nuestro departamento, con una pequeña modificación de la fase móvil. La composición inicial de la misma era agua de grado HPLC llevada a pH 2.2 con ácido sulfúrico. Esta fase provocaba una señal a 215 nm. Fue necesario la sustitución de este ácido por el ácido metafosfórico para conseguir el pH de 2.2 necesario para el análisis de estos compuestos.

El RSD del método, obtenido sometiendo 10 porciones de la misma muestra al proceso completo de análisis, fue de 3.23, 2.11, 2.40, 3.90, 1.70 y 3.93 para el ácido oxálico, quínico, málico, cítrico, fumárico y vitamina C, respectivamente.

#### 4.2.- COMPOSICIÓN QUÍMICA

Este estudio ha sido objeto de una publicación en la revista *Food Chemistry* (López Hernández y col., 1996 a).

En la Tabla III se recoge la composición química del pimiento tipo Padrón, obtenida a partir del presente estudio.

El contenido en humedad que presenta este fruto, es muy similar a los datos reportados en la bibliografía para los pimientos comunes (ver Tabla I).

Los cromatogramas de carotenoides y clorofilas correspondientes a un patrón y una muestra de pimiento tipo Padrón se recogen en las Figs. 6 y 7 respectivamente.

Los espectros de los componentes a análisis aparecen reflejados en las Figs. 8 (xantofilas minoritarias), 9 (clorofilas), 10 ( $\beta$ -caroteno), y 11 (luteína).

La luteína es la xantofila predominante con 1.6 mg/100g de muestra fresca, valor considerablemente inferior al reportado por Belitz y Grosch (1988). Señalar la presencia de otra xantofila identificada como criptoxantina por comparación de su espectro UV-VIS con la bibliografía (Chen y Yang, 1992) que no fue cuantificada ya que aparece en muy pequeña cantidad. El  $\beta$ -caroteno fue el único caroteno detectado con 0.92 mg/100g de muestra fresca, valor notablemente más bajo al encontrado por Rico Ávila (1983) y Belitz y Grosch (1988), pero similar, aunque algo superior, al encontrado por otros autores en otro tipo de pimientos (Sechi, 1967; Diem y Lenter, 1975; Primo Yúfera, 1979). El contenido de clorofila *a* fue más alto que el contenido de clorofila *b* (7.9 frente a 3.4 mg/100g ).

En la Figs. 12 y 13 se muestran los cromatogramas de ácidos orgánicos y vitamina C correspondientes a un patrón y a una muestra fresca de pimiento tipo Padrón, respectivamente.

La cantidad media de vitamina C encontrada en el pimiento tipo Padrón es de 24 mg/100g de muestra fresca, valor muy inferior a los recogidos en la Tabla I de composición para pimientos comunes.

Los ácidos orgánicos mayoritarios de los pimientos tipo Padrón son los ácidos málico y quínico, encontrándose ambos en cantidad similar, 208 y 183 mg/100g de muestra fresca, respectivamente). El tercer ácido orgánico más abundante es el oxálico, 140 mg/100g, seguido del cítrico 28 mg/100g y fumárico, que se encuentra en muy pequeña proporción 1.1 mg/100g.

En las Figs.14a, 15a y 16a, se muestran los cromatogramas correspondientes a los patrones de azúcares, almidón (como glucosa) y pectinas (como ácido galacturónico). Así mismo, en las Figs. 14b, 15b y 16b, se muestran los cromatogramas de azúcares, almidón y pectina respectivamente correspondientes a una muestra de pimiento tipo Padrón.

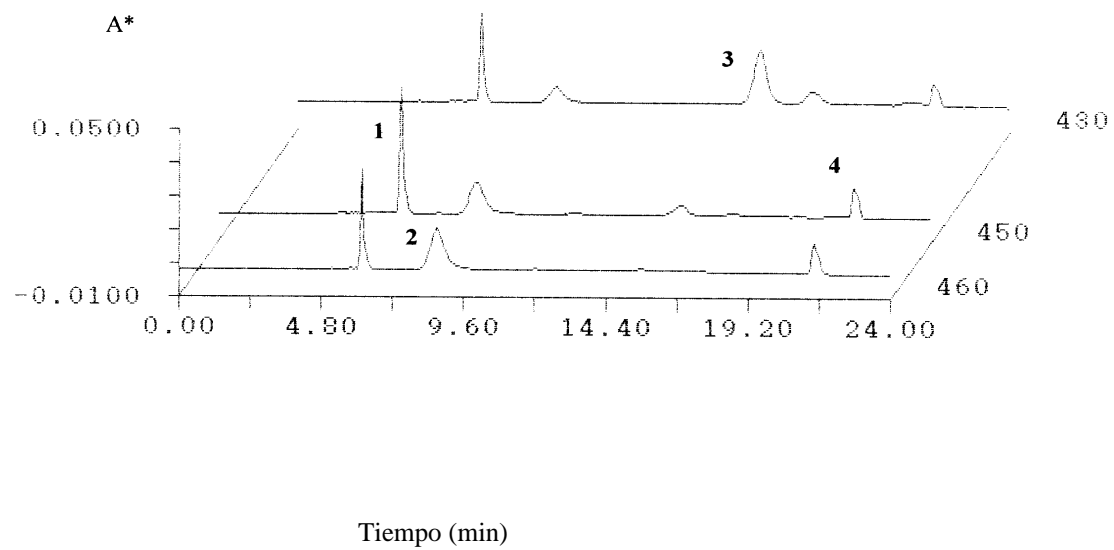
Los azúcares solubles detectados en este fruto son fructosa y glucosa, encontrándose ambos en cantidad muy similar (0.75 y 0.85 g/100g de muestra fresca, respectivamente). Entre los polisacáridos destacan la fibra insoluble seguida de pectinas y almidón, siendo sus respectivos valores de 2.2, 0.73 y 0.81 g/100g de muestra fresca. Al comparar estos datos con los recogidos por otros autores para pimiento dulce se puede observar que estos valores de carbohidratos disponibles son inferiores a los recogidos en la bibliografía mientras que los de carbohidratos no disponibles son superiores (Tabla I).

**TABLA III.- Composición química del pimiento tipo Padrón.**

COMPONENTE	X(g/100g m.f.)	±	RSD
Agua	91	±	0.6
Glucosa	0.85	±	0.1
Fructosa	0.75	±	0.1
Sacarosa	ND		
Almidón*	0.81	±	0.2
Fibra	2.2	±	0.3
Pectinas	0.73	±	0.1
	X(mg/100g m.f.)	±	RSD
Acido Cítrico	28	±	12
Acido Fumárico	1.1	±	0.4
Acido Málico	208	±	18
Acido Oxálico	140	±	24
Acido Quínico	183	±	62
Vitamina C	24	±	12
Clorofila a	7.9	±	2.
Clorofila b	3.4	±	0.6
all-trans-luteína	1.6	±	0.3
all-trans-β-caroteno	0.92	±	0.4

\* expresado como glucosa.

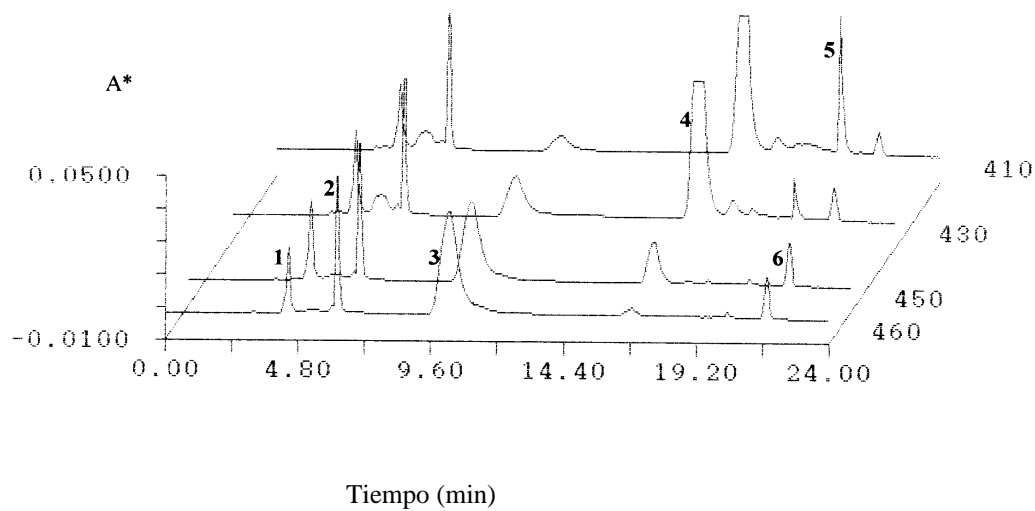
ND: No detectado



(1) Luteína, (2) Clorofila b, (3) Clorofila a, (4) β-Caroteno.

A\*: (unidades de absorbancia)

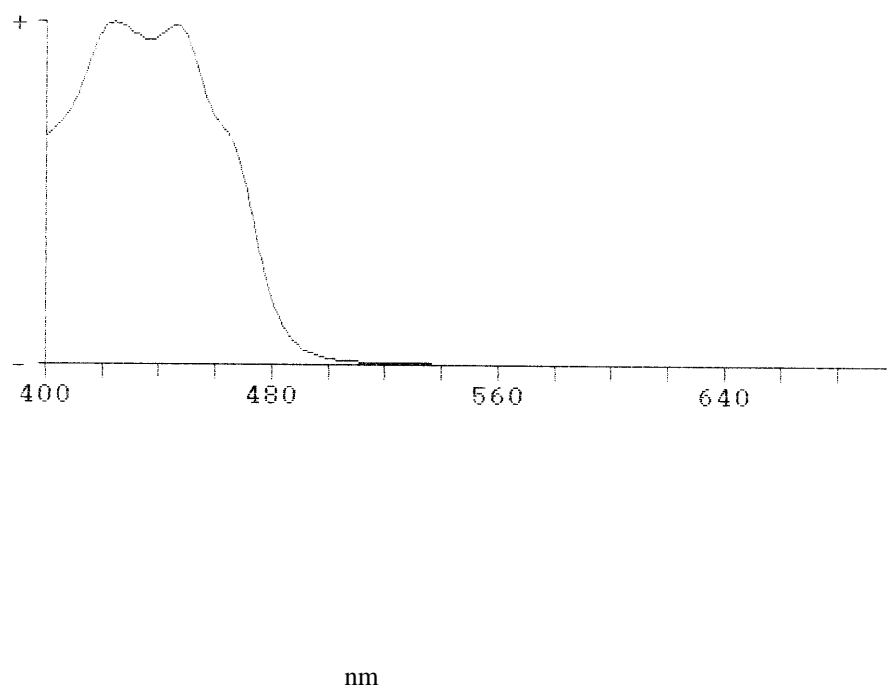
**Figura 6.- Cromatograma de una solución patrón de carotenoides y clorofilas.**



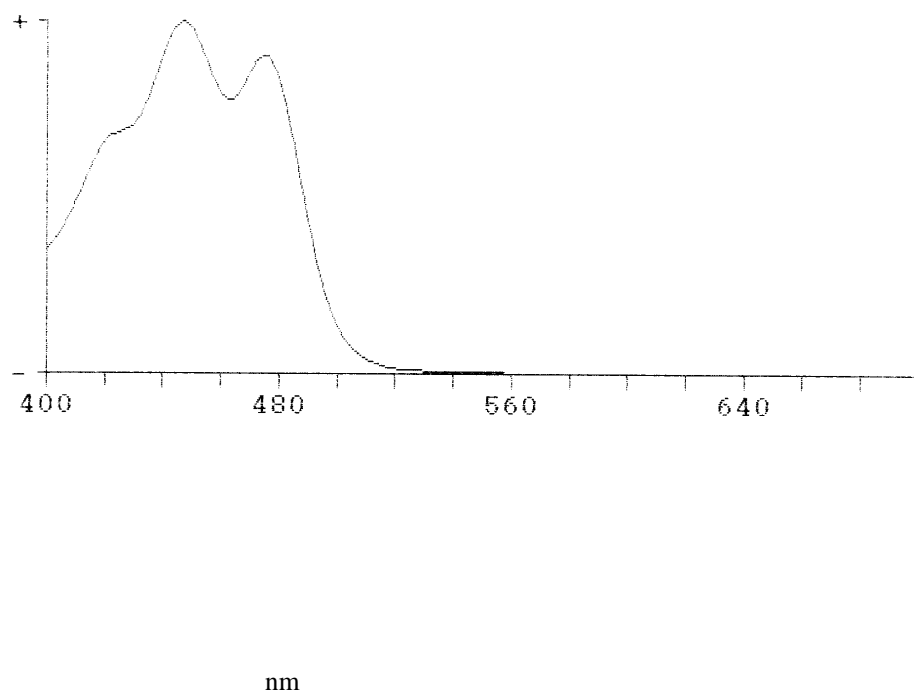
(1) Criptoxantina, (2) Luteína, (3) Clorofila a, (4) Clorofila b, (5) Feofitina a, (6)  $\beta$ -Caroteno.

A\*: (unidades de absorbancia)

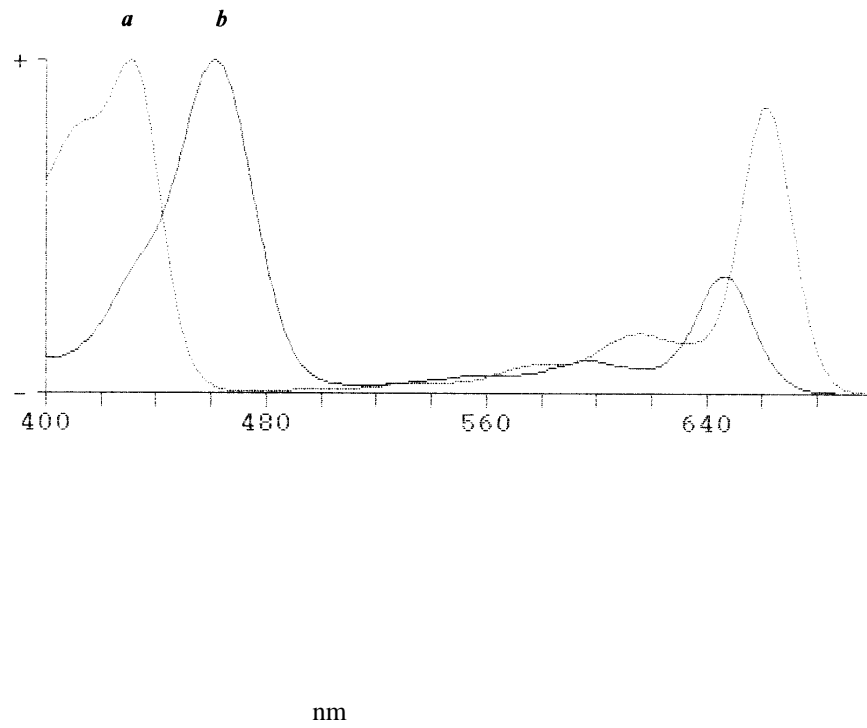
**Figura 7.- Cromatograma de carotenoides y clorofilas correspondiente a una muestra de pimiento tipo Padrón fresco.**



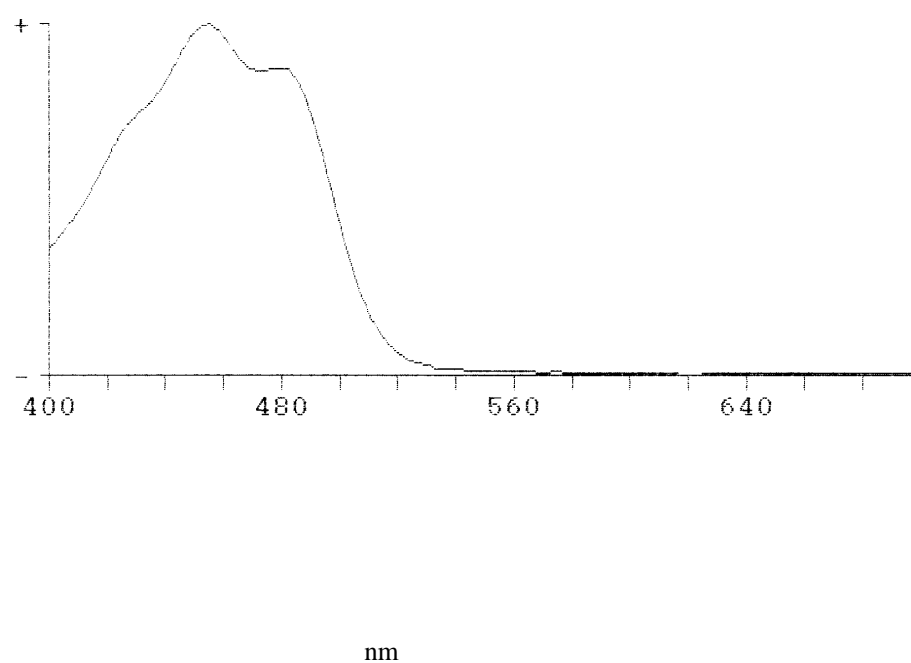
**Figura 8.- Espectro visible de la criptoxantina (xantofila minoritaria).**



**Figura 9.- Espectro visible de la luteína.**

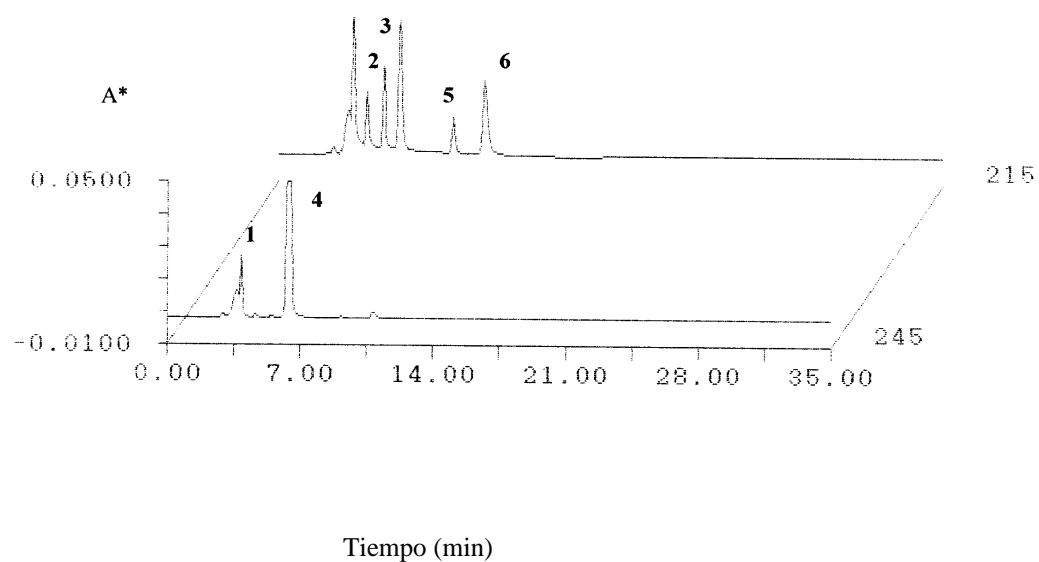


**Figura 10.- Espectro visible de la clorofila *a* y de la clorofila *b*.**



**Figura 11.- Espectro visible del  $\beta$ -caroteno**

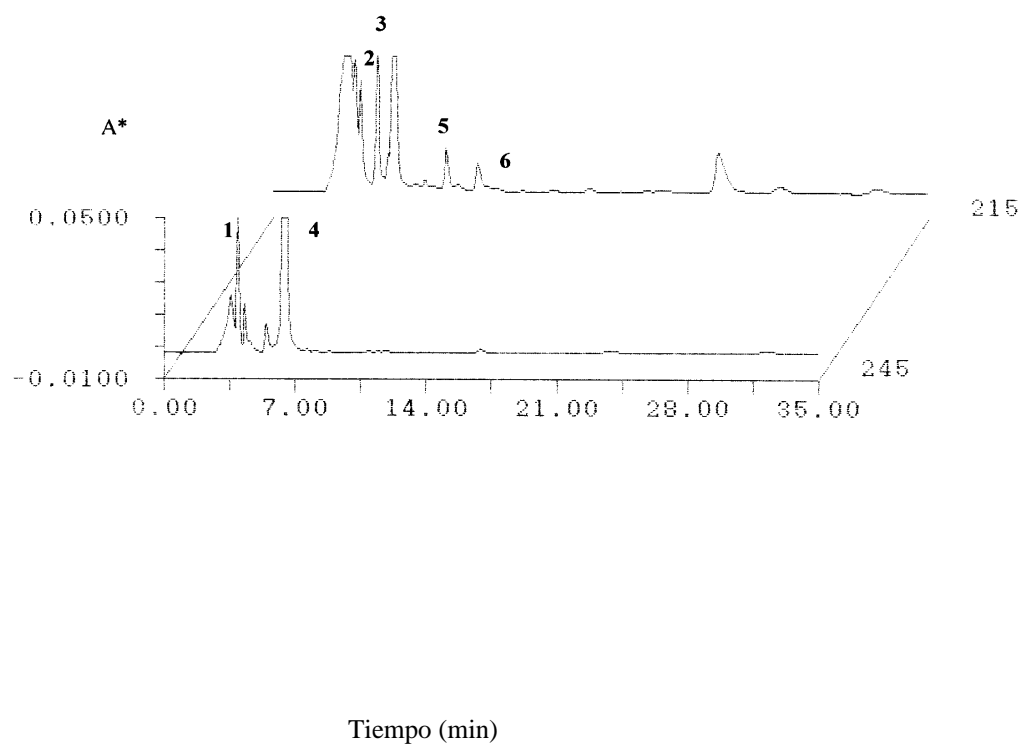




**(1) Acido Oxálico, (2) Acido Quínico, (3) Acido Málico, (4) Vitamina C, (5) Acido Cítrico, (6) Acido Fumárico.**

A\*: (unidades de Absorbancia)

**Figura 12.- Cromatograma de una solución patrón de vitamina C y ácidos orgánicos.**

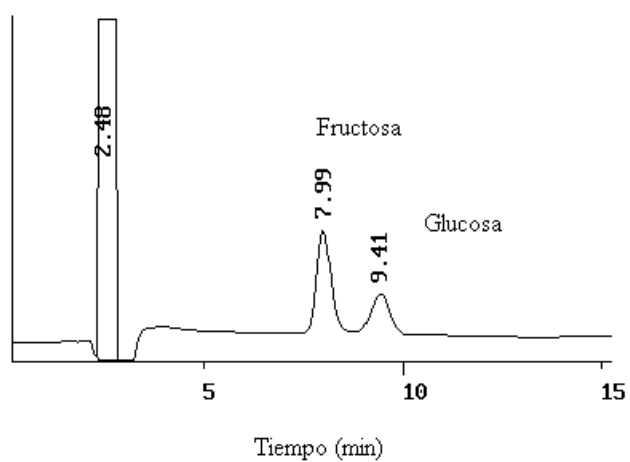


**(1) Acido Oxálico, (2) Acido Quínico, (3) Acido Málico, (4) Vitamina C, (5) Acido Cítrico, (6) Acido Fumárico.**

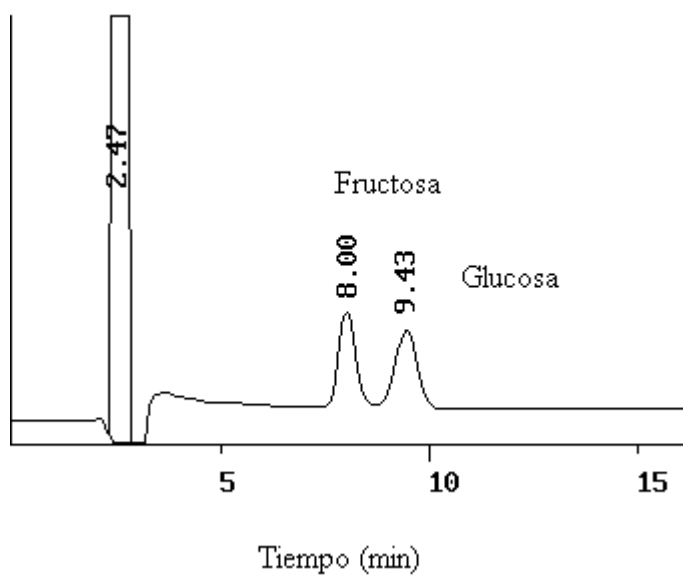
A\*: (unidades de Absorbancia)

**Figura 13.- Cromatograma de vitamina C y ácidos orgánicos correspondiente a una muestra fresca de pimienta tipo Padrón.**

(a)

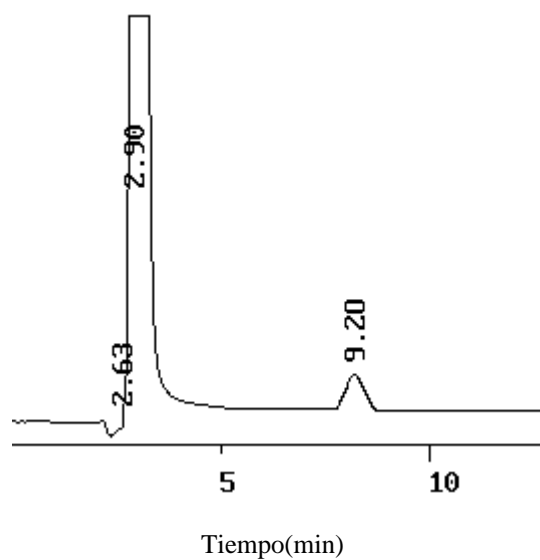


(b)

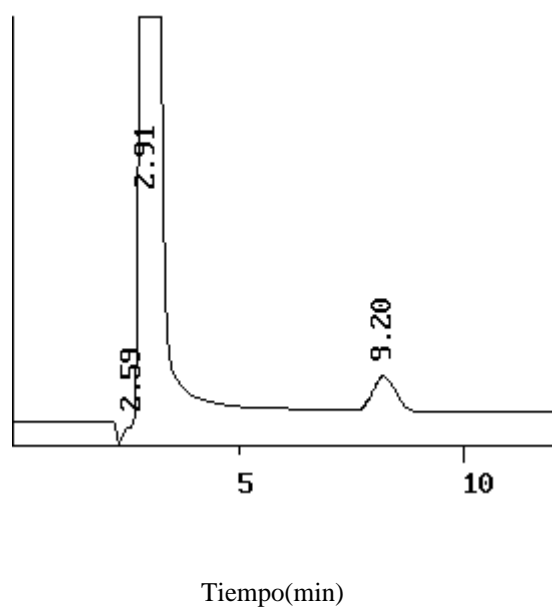


**Figura 14.- Determinación de azúcares. (a) Cromatograma de una solución patrón de azúcares, (b) Cromatograma de azúcares correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.**

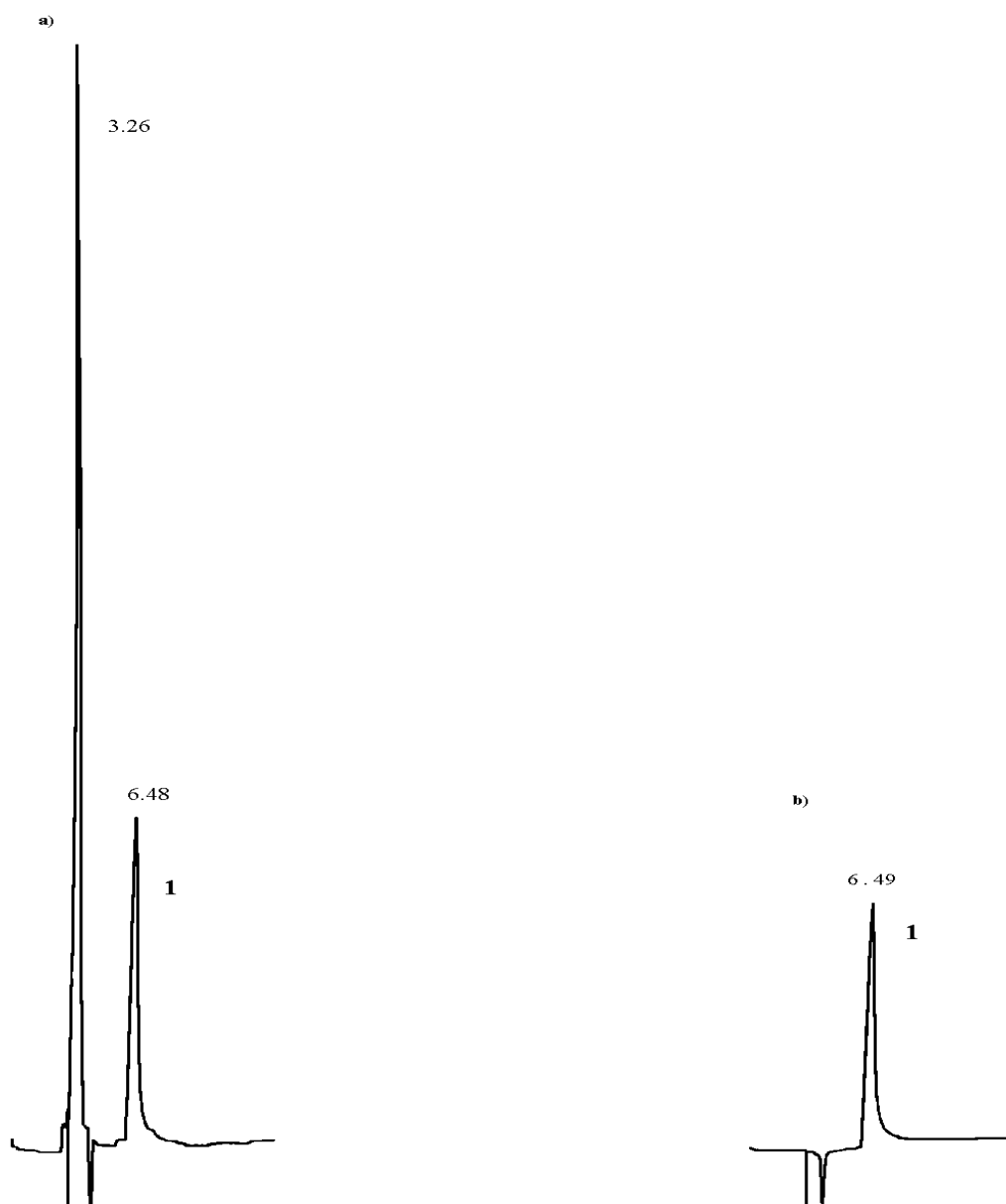
(a)



(b)



**Figura 15.- Determinación de Almidón. (a) Cromatograma de una solución patrón de glucosa, (b) Cromatograma de almidón (como glucosa) correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.**



**(1) Acido Galacturónico**

**Figura 16.- Determinación de pectinas. (a) Cromatograma de una solución patrón de ácido galacturónico, (b) Cromatograma de pectinas (como ácido galacturónico) correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.**

---

### 4.3.- CONSERVACIÓN

#### 4.3.1.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN PIGMENTOS (Xantofilas, Carotenos y Clorofilas)

La evolución de las clorofilas *a* y *b*, luteína y  $\beta$ -caroteno en pimientos tipo Padrón congelados, envasados con y sin sellado a vacío, ha sido objeto de una publicación en la revista *Z Lebensmittel Unters For* (Oruña-Concha, y col., 1996 c).

Los datos correspondientes a dicha evolución se recogen en las Figs. 17 (clorofila *a*), 18 (clorofila *b*), 19 (luteína) y 20 ( $\beta$ -caroteno) (Tablas IV,V,VI y VII, respectivamente).

Al margen de las oscilaciones observadas, en el caso de la congelación tanto manual como a vacío, todos los pigmentos mostraron una tendencia a mantenerse con respecto al valor inicial durante los 12 meses que duró el estudio.

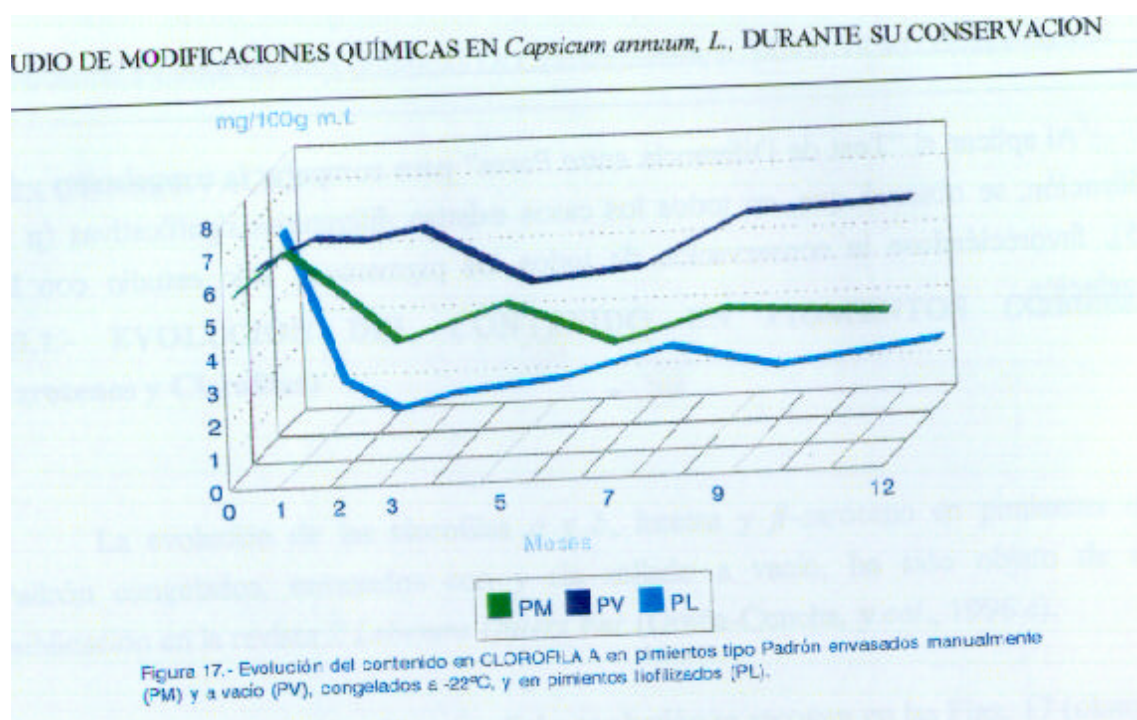
Cuando se aplica el “Test de Diferencia entre Pares” para comparar ambos tipo de empaquetado, sólo se observan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la clorofila *a*, obteniéndose mejores resultados con el empaquetado a vacío.

La evolución de la clorofila *a*, clorofila *b*, luteína y  $\beta$ -caroteno en estos pimientos tipo Padrón sometidos al proceso de liofilización ha sido objeto de una publicación en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (González-Castro y col., 1996 d).

La liofilización supuso un descenso de todos los pigmentos: 2.0, 13, 17 y 57 % para clorofila *a*, clorofila *b*, luteína y  $\beta$ -caroteno respectivamente. Al mes de almacenamiento el descenso se acentuó en la clorofila *a* (80%) y luteína (26%) con respecto al valor recién liofilizado. El contenido en  $\beta$ -caroteno no se vio modificado al 1º mes de almacenamiento, pero sí al 2º mes, experimentando una disminución del 62%.

Durante los 12 meses de análisis los valores de los pigmentos tendieron a mantenerse con respecto al 1º mes de almacenamiento, a excepción del  $\beta$ -caroteno que se mantuvo con respecto al 2º mes.

Al aplicar el “Test de Diferencia entre Pares” para comparar la congelación y la liofilización, se observó que, en todos los casos existían diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), favoreciéndose la conservación de todos los pigmentos bajo estudio con la congelación.



**Tabla IV.-** Evolución del contenido en CLOROFILA “a” en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	5.52	5.92	5.80
1	6.75	6.36	1.23
2	5.45	6.27	0.33
3	3.98	6.59	0.75
5	5.00	4.83	1.08
7	3.69	5.16	1.92
9	4.61	6.70	1.22
12	4.35	6.93	1.86

**Tabla V.-** Evolución del contenido en CLOROFILA “b” en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	2.66	2.66	2.41
1	3.04	2.83	2.60
2	1.62	2.65	2.18
3	2.44	2.94	2.52
5	2.47	2.32	1.59
7	2.06	2.58	2.23
9	3.05	2.95	2.05
12	2.32	2.87	2.83

**Tabla VI.-** Evolución del contenido en LUTEINA en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	1.27	1.27	1.17
1	1.49	1.66	0.86
2	1.42	1.53	0.91
3	1.19	1.61	0.87
5	1.02	1.36	0.59
7	0.94	1.48	0.74
9	1.81	1.31	0.82
12	0.97	1.40	0.89



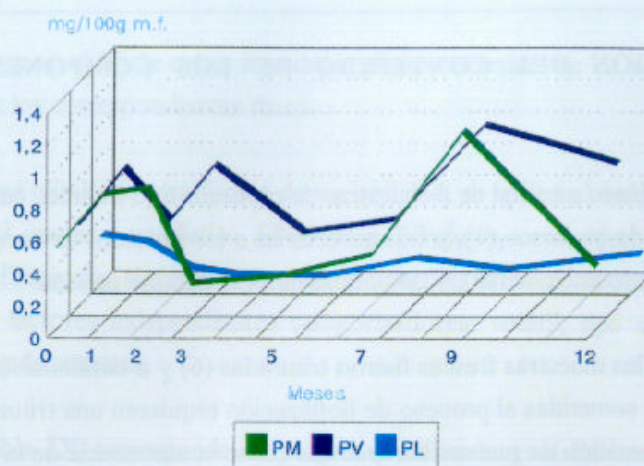


Figura 20.- Evolución del contenido en  $\beta$ -CAROTENO en pimientos tipo Padrón envasados manualmente (PM) y a vacío (PV), congelados a  $-22^{\circ}\text{C}$ , y en pimientos liofilizados (PL).

**Tabla VII.-** Evolución del contenido en  $\beta$ -CAROTENO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a  $-22^{\circ}\text{C}$ , y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.51	0.51	0.30
1	0.83	0.86	0.26
2	0.87	0.53	0.10
3	0.28	0.88	0.06
5	0.33	0.46	0.05
7	0.46	0.54	0.16
9	1.23	1.13	0.09
12	0.39	0.89	0.19

---

---

#### 4.3.2.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE LOS COMPONENTES DEL AROMA

Se han analizado un total de 6 muestras de pimiento tipo Padrón, cada una de las cuales se ha analizado en fresco (1), y tras someterlas a los procesos de congelación, con y sin vacío (2 y 3, respectivamente), y de liofilización (5) durante un mes.

Así mismo, las muestras frescas fueron trituradas (6) y a continuación analizadas, ya que las muestras sometidas al proceso de liofilización requieren una trituración previa, lo cual supone la aparición de nuevos compuestos como consecuencia de la rotura de los tejidos celulares.

Aunque es evidente que el aroma se percibe como una impresión global, y que la descripción por separado de los componentes volátiles nunca conseguirá reproducir el aroma original, el análisis directo de los componentes separados por cromatografía de gases puede tener gran interés cuando se pretenden comparar distintos perfiles aromáticos (Acree y *col.*, 1984).

El número de componentes volátiles identificados es muy elevado y de muy diversa naturaleza, se incluyen hidrocarburos, aldehidos, alcoholes, ácidos, ésteres, terpenos, etc., muchos de los cuales están presentes en los frutos intactos, si bien otros son generados solamente cuando se produce la rotura de los tejidos vegetales. Con el fin de facilitar la caracterización del perfil aromático del pimiento tipo Padrón se ha procedido a la agrupación de los mismos por “tipos” en función de su grupo funcional característico.

En las Figs. 21, 22 y 23 se muestran los cromatogramas obtenidos para los frutos enteros, frescos y congelados, con y sin vacío, y para los frutos triturados, frescos y liofilizados, respectivamente.

En la Tabla VIII se recogen los compuestos volátiles identificados por comparación de sus espectros de masas con los que aparecen en la biblioteca de espectros Wiley.

Dado que la determinación de los compuestos volátiles en los frutos enteros y triturados está sujeta a un tratamiento de muestra diferente y además los tamaños de muestra son también diferentes, se ha considerado oportuno diferenciar entre ambos tipos de frutos con el fin de evitar introducir efectos extraños en los análisis estadísticos posteriores de los correspondientes datos.

Una vez eliminada esta fuente de variabilidad, se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) del paquete estadístico SPSS para Windows, con objeto de comprobar si existen o no diferencias significativas entre los perfiles aromáticos obtenidos en función de diferentes factores independientes categorizadores: volátil, tipo de tratamiento de conservación y de muestra.

---

La Tabla IX corresponde al programa utilizado y al informe obtenido en el estudio de si las diferencias observadas en la composición de volátiles están en función de las tres variables independientes siguientes (con sus respectivos niveles):

- 1.- Los diferentes volátiles identificados (códigos) (71)
- 2.- El proceso de conservación empleado: 1) Fruto entero fresco, 2) Fruto entero congelado al vacío y 3) Fruto entero congelado sin vacío.
- 3.- El número de muestras analizadas (6).

La variable dependiente (standari) corresponde a la respuesta del detector (MS) en cuentas de área para cada volátil normalizada a tamaño de muestra unidad (1 g).

Las conclusiones que pueden deducirse son las siguientes:

- 1) Las diferencias son significativas en cada uno de los efectos principales (códigos ( $p = 0.000$ ), conservación ( $p = 0.000$ ) y muestra ( $p = 0.018$ ).
- 2) Todas las interacciones posibles a dos niveles son significativas: a) volátil identificado y proceso de conservación; b) volátil identificado y muestra analizada; y c) proceso de conservación y muestra analizada ( $p = 0.000$ ).

En la Tabla X se muestra tanto el programa como los resultados de aplicar el ANOVA a los frutos triturados, frescos y liofilizados. Se observa que entre las muestras no hay diferencias significativas. Puede verse que tanto los efectos principales (códigos y conservación) como la interacción (volátil identificado y proceso de conservación) son significativos a un nivel de  $p = 0.000$ .

Por último, ya que el proceso de trituración lleva consigo la rotura de los tejidos celulares y con ello la aparición de nuevos volátiles, se consideró interesante aplicar el ANOVA a dichos estados (fruto fresco entero y fruto fresco triturado) y comprobar si existían o no diferencias significativas entre los mismos (ver Tabla XI). A la vista de los resultados puede concluirse que tanto los efectos principales (códigos y conservación) como la interacción (volátil identificado y procesado del fruto) son significativos a un nivel de  $p = 0.000$ .

Como se puede observar, unicamente en el primero de los ANOVA, el que compara los perfiles sensoriales de los pimientos enteros frescos y congelados, con y sin vacío, el tipo de muestra aparece como un factor significativo a la hora explicar la varianza total de las áreas normalizadas de los distintos volátiles. Es más, también son significativas las interacciones de orden dos en las que aparece la variable independiente muestra. Esto indica que existen variaciones significativas entre las distintas muestras analizadas tras los tratamientos de congelación que afectan de manera distinta a los componentes volátiles estudiados, lo cual implica que el proceso de congelación en si no da lugar a un perfil aromático

---

característico, siempre y cuando estas mismas diferencias no se observen en el caso de las muestras frescas enteras, pues entonces la variabilidad podría ser en parte atribuible a la metodología analítica empleada en la determinación de aromas.

Por lo demás, y como parecería lógico a priori, en términos generales (para los 3 ANOVA), el perfil aromático de las muestras analizadas va a depender del aroma en cuestión y del tipo de tratamiento de conservación. Además, puesto que las interacciones de segundo grado de las variables independientes volátiles y conservación son también significativas, los tratamientos de conservación van a afectar de distinta manera a los componentes volátiles estudiados que configuran el perfil aromático.

Para visualizar con claridad los resultados de estos ANOVA, se realizaron 2 tipos de representaciones gráficas:

1.- Mediante el programa StanfordGraphics versión 2.1c (3-D Visions Corporation) se han elaborado los “perfiles aromáticos” para los distintos procesos de conservación en función de los tipos de compuestos volátiles identificados, incluidos los perfiles de los frutos frescos, tanto enteros como triturados (ver Figs. 24, 25 y 26). En dichas gráficas el color evoluciona desde el *rojo* (ausencia) hasta el *violeta* (máxima concentración), pasando por el naranja, amarillo, verde, azul y añil. La escala fue ajustada al componente mayoritario en cada perfil, atendiendo a las áreas de cada tipo de volátil en cada muestra, normalizadas según el tamaño de la misma.

De las mismas se desprende que sólo podría hablarse de perfil aromático característico en el caso de las muestras analizadas en fresco, ya sean enteras o trituradas, y aquellas liofilizadas tras el proceso de trituración. En estos predominan unos tipos de compuestos característicos; pero para tratar de identificar con mayor seguridad que tipos son, es más conveniente trabajar con una muestra tipo para cada tratamiento de conservación en vez de con cada una de las 6. De ahí que para evitar seleccionar una de ellas, se haya recurrido a tomar como tipo una cuyo perfil represente los valores centrales (medianas) de las áreas normalizadas de cada uno de los componentes volátiles.

2.- Con las medianas de la áreas de las 6 muestras para cada uno de los tipos de volátiles, en cada uno de los tratamientos, y mediante el programa Harvard Graphics versión 4.0 (para Windows 95) se elaboraron las gráficas correspondientes a las figuras 27, 28 y 29, donde aparecen representados los totales de los valores para los distintos tipos de volátiles (en miles de cuentas de área) en función del tratamiento de la muestra y del proceso de conservación utilizado.

De los gráficos puede deducirse que:

---

La composición de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón difiere claramente según sea la preparación de la muestra (entera o triturada) y el proceso de conservación al que sea sometido (congelación, con y sin vacío, y liofilización).

El perfil aromático del pimiento tipo Padrón fresco entero está formado principalmente por compuestos volátiles pertenecientes a los grupos de los éteres, pirroles, azufrados y pirazinas. En cambio, si los frutos son triturados, como consecuencia de dicha rotura celular, se desencadena la formación de nuevos volátiles (oxoácidos, aldehídos y alcoholes alifáticos), derivados de la oxidación de ácidos grasos insaturados por la acción de las lipoxigenasas, ya sean solas o en combinación con la hidroperóxido liasa (Belitz y Grosch, 1988).

En las frutas y hortalizas, la actuación de estas enzimas sobre los ácidos grasos linoleico y linolénico da lugar a la formación de los aldehídos hexanal y (E)-2-Hexenal, respectivamente. Con frecuencia estos aldehídos aparecen, junto con alguno de los alcoholes derivados a partir de ellos, inmediatamente después de la desintegración del tejido en presencia de oxígeno, tal es el caso de los alcoholes 1-Hexanol y 3-Hexen-1-ol. Es conocida la contribución del alcohol 3-Hexen-1-ol y del aldehído (E)-2-Hexenal a la “nota verde” en los vegetales (Belitz y Grosch, 1988); Wu y Liou (1986) señalan que la rotura de los tejidos celulares de las especies del género *capsicum*, además de favorecer la formación de los compuestos mencionados anteriormente, también contribuye a la formación de compuestos de estructura furanósica, tales como el 2-etil y 2-pentilfuranos, derivados del ácido linoleico.

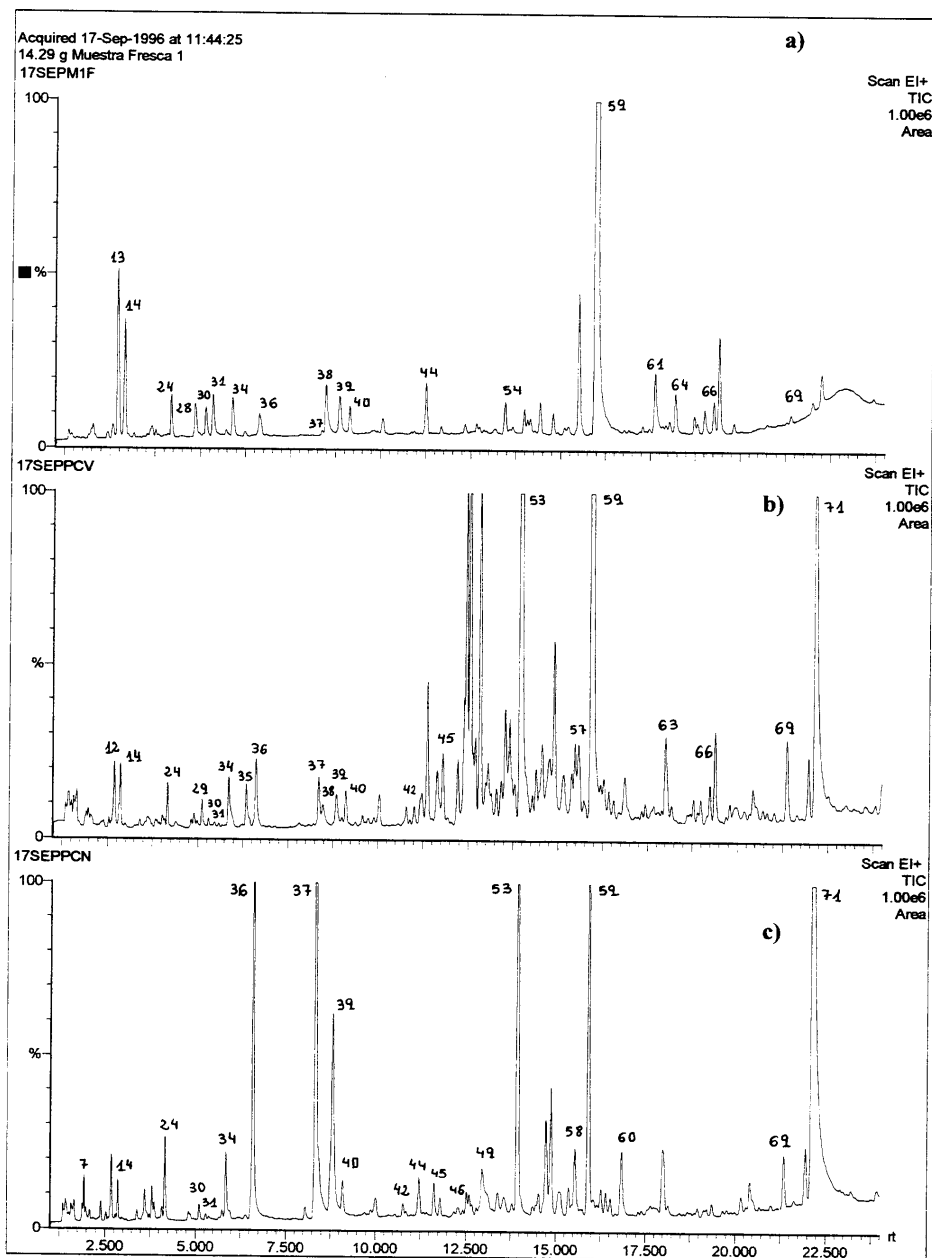
Además, en el pimiento tipo Padrón triturado también se encuentran en cantidades apreciables pirazinas, fenoles y ésteres.

En el aroma característico de las distintas especies del género *capsicum* destaca por su contribución de una manera muy notable la 2-isobutil, 3-metoxipirazina, formada por reacción de Maillard a partir de la leucina (Murray and Whitfield, 1975; Chitwood y col., 1983). Las pirazinas son compuestos aromáticos poderosos (Belitz y Grosch, 1988).

Tras ser sometido al proceso de congelación se observa que la composición del perfil aromático cambia notablemente. Si la congelación se realiza al vacío, destaca el aumento en la concentración de las pirazinas, la desaparición de los compuestos azufrados y la aparición de terpenos, en cambio si la congelación se realiza de forma manual el grupo mayoritario corresponde al de los fenoles, si bien, la concentración de los terpenos se duplica frente a la congelación al vacío, y la de los éteres y pirroles se reduce a la mitad con respecto a la del fruto fresco.

Los terpenos son importantes ya que crean un amplio espectro de aromas percibido casi siempre como muy agradable, siendo utilizados frecuentemente para la aromatización de alimentos (Belitz and Grosch, 1988).

Por último, el proceso de liofilización supone la práctica desaparición de todos los compuestos volátiles presentes en los frutos frescos triturados a excepción de los aldehídos y pirroles. Es importante la presencia del aldehído 3-metilbutanal en las muestras liofilizadas, formado a partir del aminoácido leucina por el mecanismo de degradación de “strecker” (reacción no enzimática), la cual se verifica en los alimentos cuando se someten a altas temperaturas. Contribuye con una “nota verde” en el aroma. Su umbral olfatorio ( $\mu\text{g/l}$ ;  $\text{H}_2\text{O}$ ) es de 3 (Belitz y Grosch, 1988).



**Figura 21.-** TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón fresco (a), y tras someterle al proceso de congelación, con y sin vacío (b y c, respectivamente).

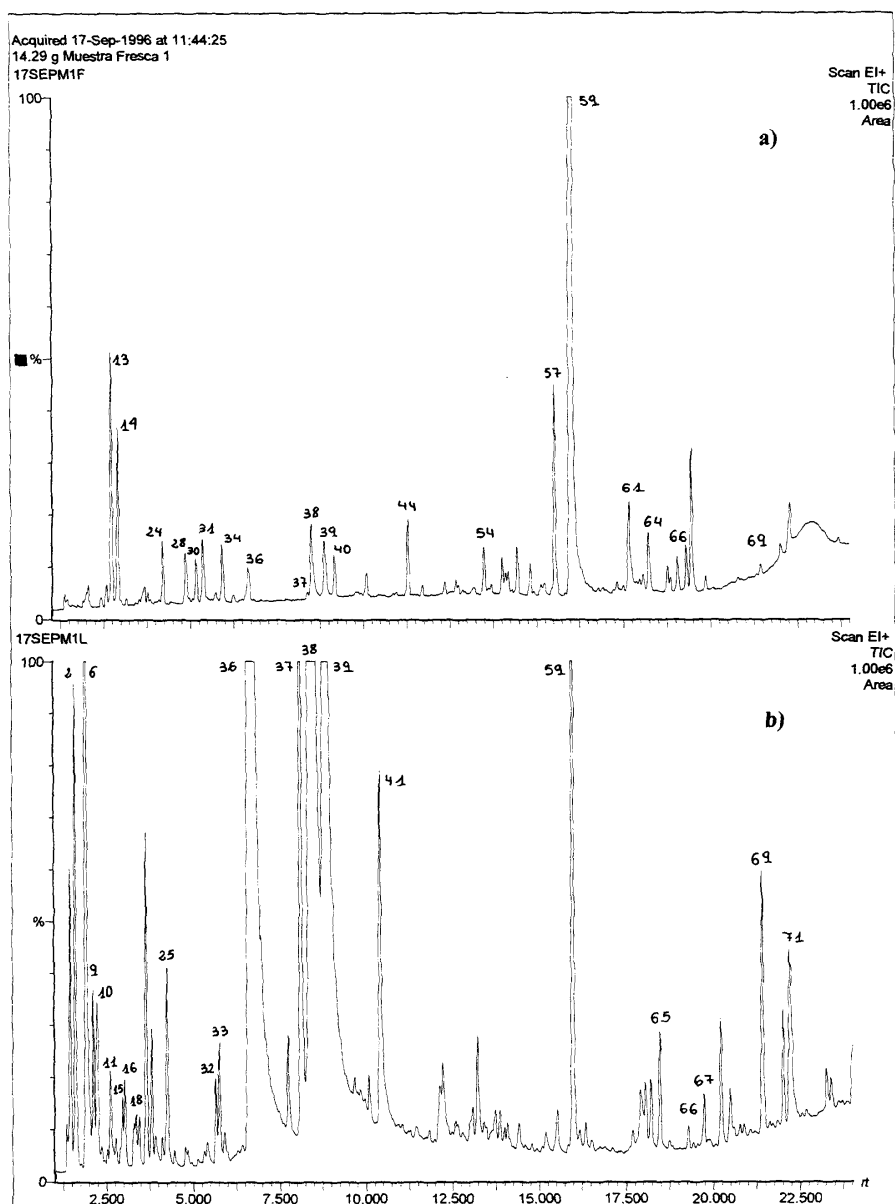


Figura 22.- TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimiento tipo Padrón fresco: (a) Fruto Entero y (b) Fruto Triturado.



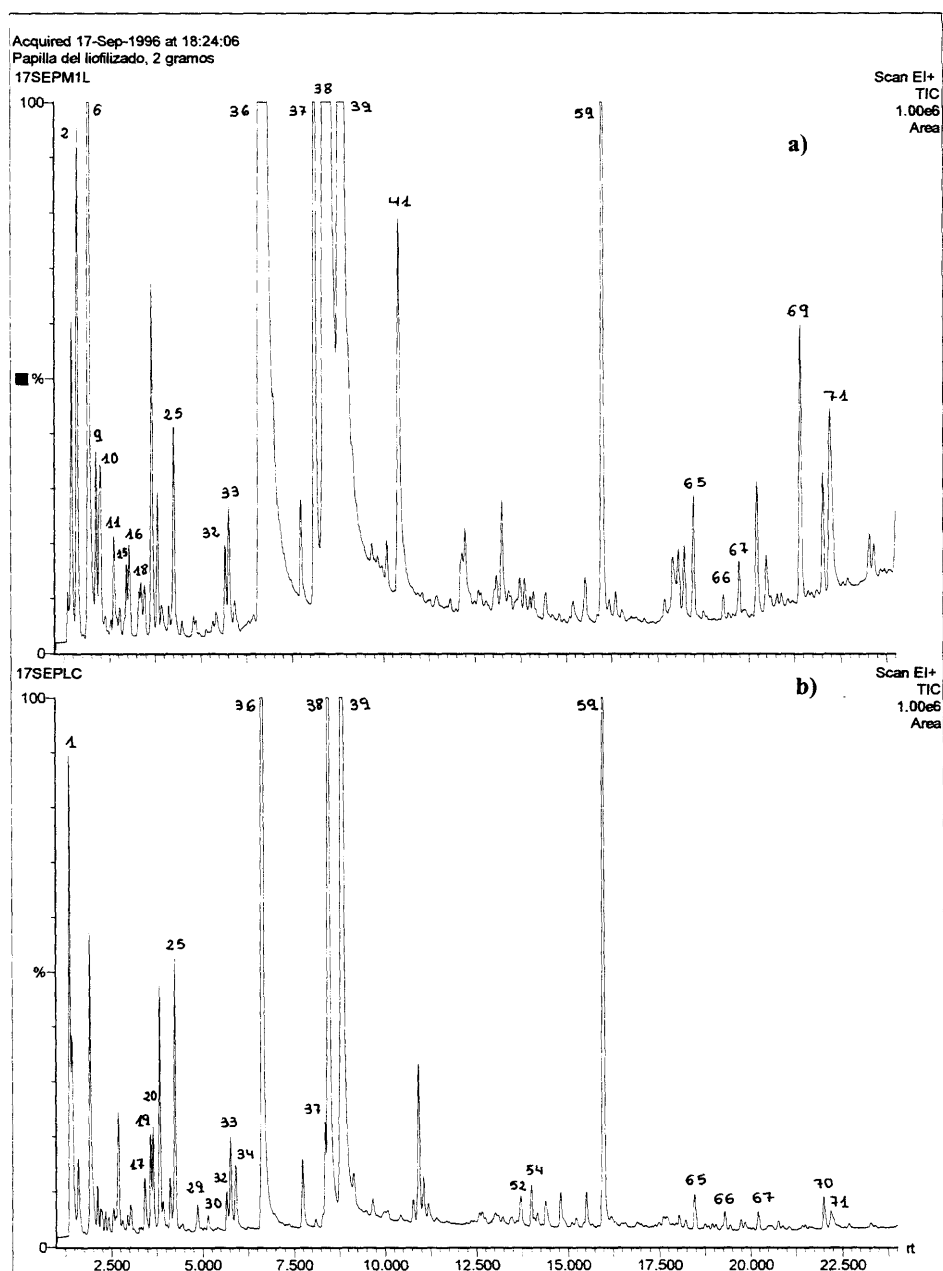


Figura 23- TIC-Cromatograma de los compuestos volátiles del pimienta tipo Padrón: (a) Fruto Fresco Triturado y (b) Fruto Liofilizado.

**TABLA VIII.- Relación de los compuestos volátiles identificados en el pimiento tipo Padrón fresco (F), triturado (T), congelado, con y sin vacío (V y N, respectivamente), y liofilizado (L).**

Nº	rt	COMPUESTO VOLÁTIL	F	T	V	N	L	TIPO (*)	Nº ENTRADA WILEY
1	1.359	Ciclobutanol	+				+	1	118760
2	1.459	1-Propene		+				10	59
3	1.609	1-3, Butadiene		+				10	118317
4	1.717	Etanol	+					1	94
5	1.901	1- Pentene		+	+	+	+	10	350
6	1.926	(Z) 2-Pentene		+				10	351
7	1.934	Pentano	+		+	+	+	10	118774
8	2.009	Isopreno	+	+	+	+	+	10	118589
9	2.126	(E) 1,3-Pentadiene		+		+		10	118584
10	2.243	1,3-Ciclopentadiene		+				10	259
11	2.626	1-Hexene		+				10	119201
12	2.686	3-Metil-2-heptanol			+			1	7458
13	2.712	Hexano	+	+	+	+	+	10	1018
14	2.912	Furán-2-Metil	+		+	+		8	663
15	2.968	1-Hexine		+			+	10	119077
16	3.043	1,3-Pentadiene, 3-Metil (E)		+			+	10	683
17	3.043	2,4-Hexadiene					+	10	678
18	3.360	2-Hexen-4-ine (Z)		+				10	600
19	3.418	Butanal,3-metil=Isovaleraldehido					+	2	119356
20	3.643	Benceno	+	+	+	+	+	10	119006
21	3.810	1-Penten-3-ol			+	+	+	1	974
22	4.094	3-Pentanona		+				3	119370
23	4.110	Ciclopentanol		+		+	+	1	119406
24	4.196	Heptano	+		+	+		10	120425
25	4.253	Furán-2-etil		+			+	8	1503
26	4.378	1,4-Dioxano	+	+	+	+		8	119546
27	4.477	Ciclohexanona					+	3	120065
28	4.854	Metil ciclohexano	+					10	120140
29	4.861	1-Nonanol	+	+	+	+	+	1	125281
30	5.146	1-H-Pirrol, 1-metil	+	+	+	+	+	9	119054
31	5.346	Disulfuro de Dimetilo	+		+	+		11	119805
32	5.653	1-Pentanol		+			+	1	1169
33	5.753	2-Penten-1-ol (Z)		+			+	1	975
34	5.897	Metil benceno	+		+	+	+	10	1321
35	6.346	Etil-2-Hexene-1			+			10	3570
36	6.639	Hexanal	+	+	+	+	+	2	120294
37	8.396	2-Hexenal (E)	+	+	+	+	+	2	1687
38	8.483	3-Hexen-1-ol (Z)	+	+	+	+	+	1	120364
39	8.866	1-Hexanol	+	+	+	+	+	1	2364
40	9.150	o-Dimetil benceno	+		+	+		8	2699
41	10.415	2,4-Hexadienal (E,E)		+				2	1487
42	10.790	Isocitronellen			+	+		5	9653
43	11.242	1,7-Octadien-2,6-Dimetil (E,Z)				+		10	9645
44	11.268	Triciclono	+		+	+		5	124417
45	11.640	α-Pineno	+		+	+	+	5	124388
46	11.807	1,6-Octadiene, 3,7-Dimetil				+		10	9644
47	12.266	1,4,6-Heptatriene, 2,3,6-trimetil	+					10	8984
48	12.599	Tolueno-p-etil			+	+		10	5057
49	12.957	Fenol		+		+		7	1389
50	13.119	p-Ment-2-ene-trans				+		5	9707

51	13.569	β-Pineno			+	+		5	9740
52	13.699	Furán-2-pentil					+	8	9517
53	13.966	Decano			+	+		10	125045
54	13.994	Benceno (1,3,3-trimetilnonil)	+				+	10	55891
55	14.458	Carane			+	+		5	124650
56	15.162	Mesitileno				+		10	5060
57	15.476	DL-Limoneno	+	+	+	+	+	5	124342
58	15.550	1,8-Cineol			+	+		5	126660
59	15.987	Delta-3-Careno	+	+	+	+	+	5	124411
60	16.850	Dihidro mircenol	+		+	+		5	16451
61	17.631	Benzil alcohol, α,α dimetil	+					1	124244
62	17.897	Linalol	+	+	+			5	126535
63	18.002	Undecano			+			10	126867
64	18.206	nonanal	+		+			2	125003
65	18.461	Acido Isobutirico, hexil ester		+			+	4	23227
66	19.282	2,4,6-Octatriene,2,6-dimetil (E,Z)	+		+		+	10	9113
67	19.729	Ac. Butanoico,3-Hexenil ester (Z)		+			+	4	22325
68	20.373	trans-2-Tridecenal			+			2	34000
69	21.347	2-isobutil-3-metoxipirazina	+		+	+		6	20259
70	22.002	nonano					+	10	123225
71	22.196	Salicilato de metilo		+	+	+	+	8	14253

(\*) : (1) Alcohol, (2) Aldehido, (3) Cetona, (4) Ester, (5) Terpeno, (6) Pirazina, (7) Fenol, (8) Éter,  
(9) Pirrol, (10) Hidrocarburo y (11) Azufrado.

(+): Presencia.

( ): No Detectado

**TABLA IX.- ANOVA correspondiente a los “frutos enteros” (Frescos y congelados, con y sin vacío).**

MANOVA						
standari BY codigos(1 71) conserva(1 3) muestra(1 6) WITH fresco						
/NOPRINT PARAM(ESTIM)						
/METHOD=UNIQUE						
/ERROR WITHIN+RESIDUAL						
/ANALYSIS standari WITH fresco						
/DESIGN codigos conserva muestra codigos*conserva codigos*muestra conserva						
*muestra .						
***** Analysis of Variance *****						
1278 cases accepted.						
852 cases rejected because of out-of-range factor values.						
0 cases rejected because of missing data.						
1278 non-empty cells.						
1 design will be processed.						
-----						
***** Analysis of Variance-- design 1 **						
Order of Variables for Analysis						
Variates Covariates						
STANDARI						
1 Dependent Variable						
0 Covariates						
-----						
***** Analysis of Variance-- design 1 **						
Tests of Significance for STANDARI using UNIQUE sums of squares						
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F	
WITHIN+RESIDUAL	2,4965E+14	700	3,566E+11			
CODIGOS	3,0375E+14	70	4,339E+12	12,17	,000	
CONSERVA	6,0304E+12	2	3,015E+12	8,45	,000	
MUESTRA	4,9263E+12	5	9,853E+11	2,76	,018	
CODIGOS * CONSERVA	1,5942E+14	140	1,139E+12	3,19	,000	
CODIGOS * MUESTRA	1,9085E+14	350	5,453E+11	1,53	,000	
CONSERVA * MUESTRA	1,2602E+13	10	1,260E+12	3,53	,000	
(Model)	6,7758E+14	577	1,174E+12	3,29	,000	
(Total)	9,2723E+14	1277	7,261E+11			
R-Squared =	,731					
Adjusted R-Squared =	,509					

**Tabla X.- ANOVA correspondiente a los “frutos triturados” (Frescos y Liofilizados).**

MANOVA

standari BY codigos(1 71) conserva(5 6)

/NOPRINT PARAM(ESTIM)

/METHOD=UNIQUE

/ERROR WITHIN+RESIDUAL

/ANALYSIS standari

/DESIGN codigos conserva codigos\*conserva .

\*\*\*\*\* Analysis of Variance\*\*\*\*\*

852 cases accepted.

1278 cases rejected because of out-of-range factor values.

0 cases rejected because of missing data.

142 non-empty cells.

1 design will be processed.

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance-- design 1\*\*

Order of Variables for Analysis

Variates Covariates

STANDARI

1 Dependent Variable

0 Covariates

-----

\*\*\*\*\* Analysis of Variance-- design 1\*\*

Tests of Significance for STANDARI using UNIQUE sums of squares

Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	1,5448E+17	710	2,176E+14		
CODIGOS	2,8862E+17	70	4,123E+15	18,95	,000
CONSERVA	8,8363E+15	1	8,836E+15	40,61	,000
CODIGOS * CONSERVA	2,4994E+17	70	3,571E+15	16,41	,000
(Model)	5,4739E+17	141	3,882E+15	17,84	,000
(Total)	7,0187E+17	851	8,248E+14		

R-Squared = ,780

Adjusted R-Squared = ,736

**TABLA XI.- ANOVA correspondiente a los “frutos frescos” (Enteros y Triturados).**

MANOVA					
standari BY codigos(1 71) conserva(1 2)					
/NOPRINT PARAM(ESTIM)					
/METHOD=UNIQUE					
/ERROR WITHIN+RESIDUAL					
/ANALYSIS standari					
/DESIGN codigos conserva codigos*conserva .					
***** Analysis of Variance*****					
852 cases accepted.					
1278 cases rejected because of out-of-range factor values.					
0 cases rejected because of missing data.					
142 non-empty cells.					
1 design will be processed.					
-----					
***** Analysis of Variance-- design 1**					
Order of Variables for Analysis					
Variates Covariates					
STANDARI					
1 Dependent Variable					
0 Covariates					
-----					
***** Analysis of Variance-- design 1**					
Tests of Significance for STANDARI using UNIQUE sums of squares					
Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	1,3354E+17	710	1,881E+14		
CODIGOS	2,6670E+17	70	3,810E+15	20,26	,000
CONSERVA	1,0789E+16	1	1,079E+16	57,37	,000
CODIGOS * CONSERVA	2,6689E+17	70	3,813E+15	20,27	,000
(Model)	5,4438E+17	141	3,861E+15	20,53	,000
(Total)	6,7791E+17	851	7,966E+14		
R-Squared = ,803					
Adjusted R-Squared = ,764					

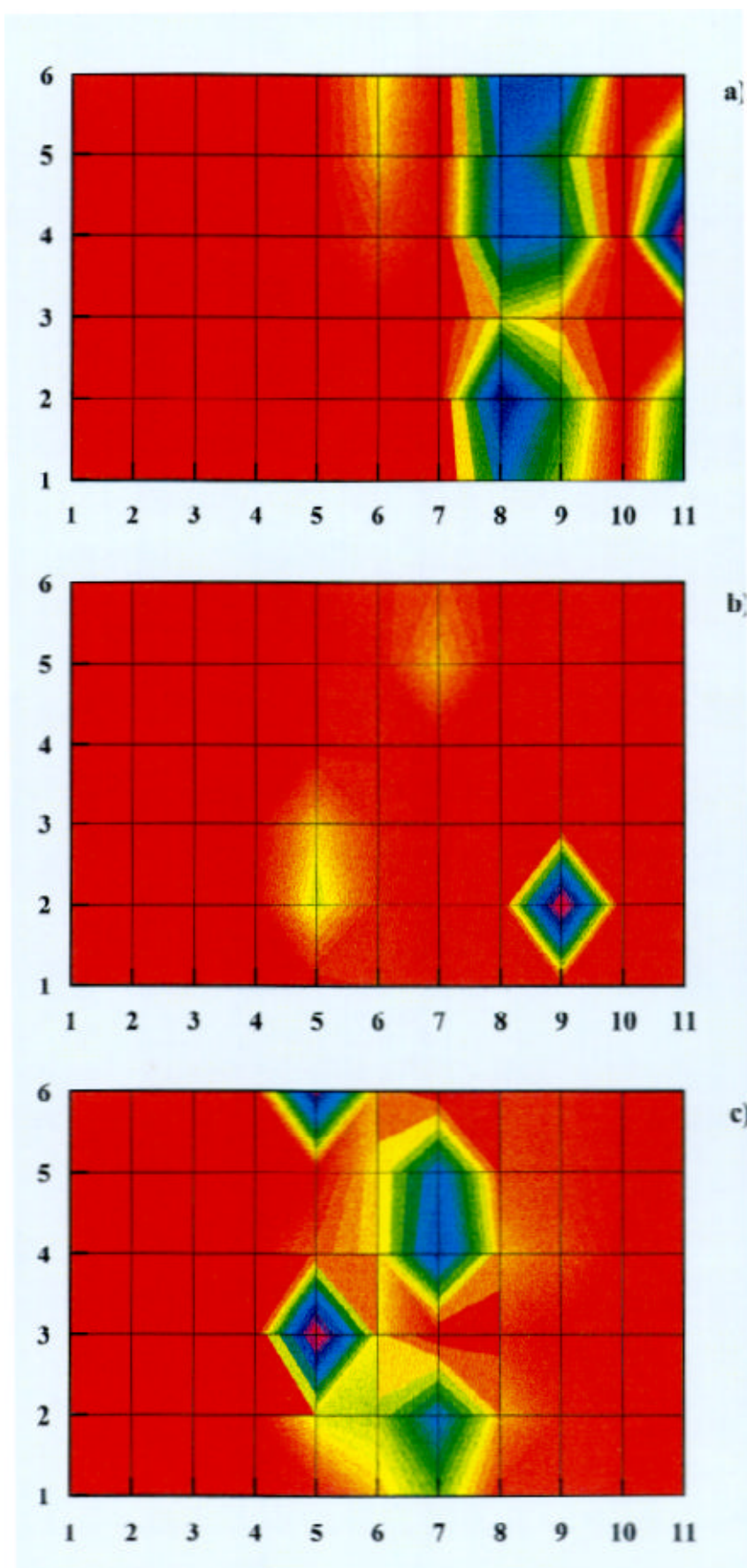
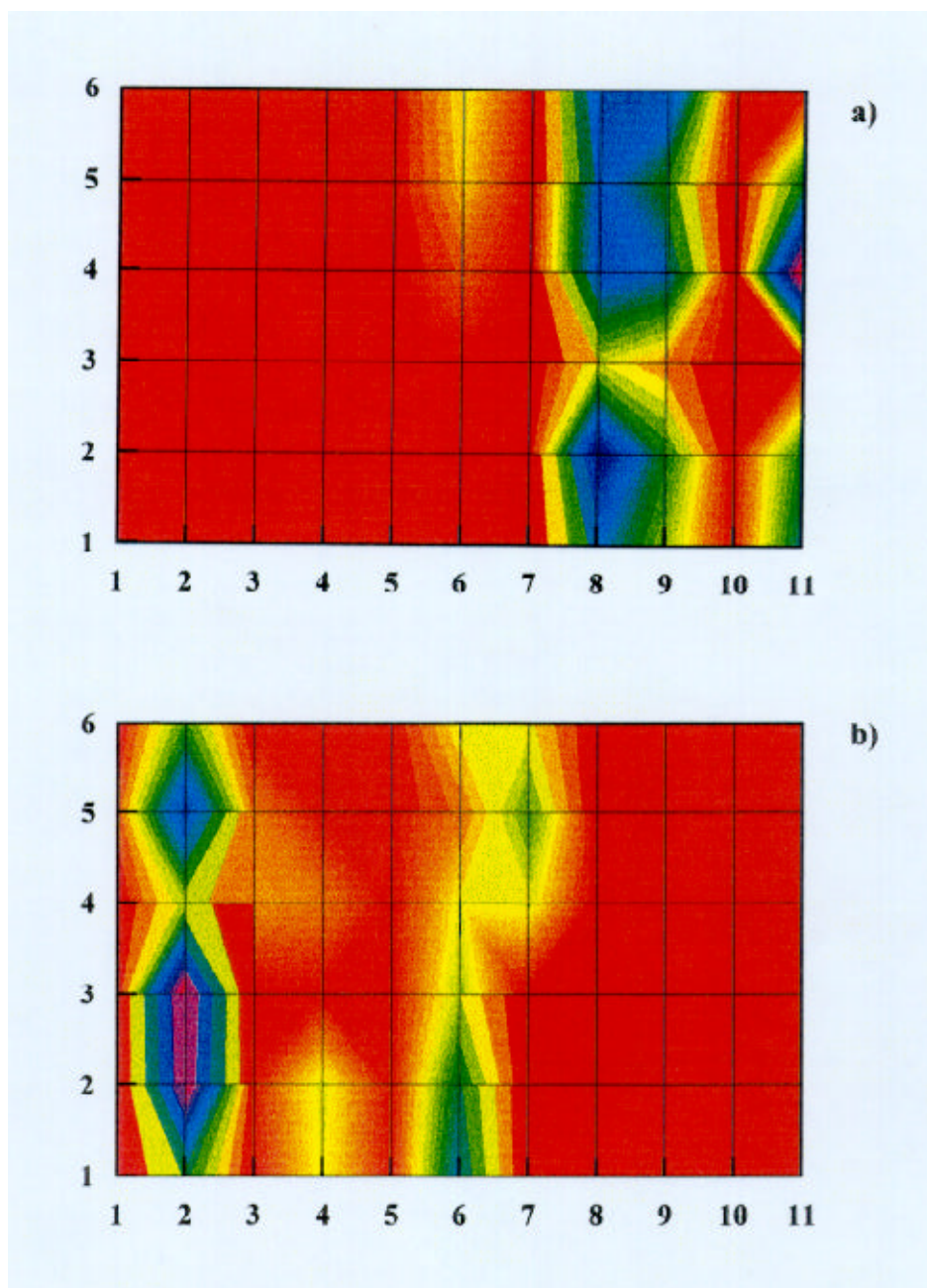


Figura 24.- Perfil aromático del pimiento tipo Padrón fresco (a) y congelado, con y sin vacío (b y c, respectivamente).



**Figura 25.- “Perfil aromático” del pimiento tipo Padrón fresco: (a) Fruto Entero y (b) Fruto triturado.**



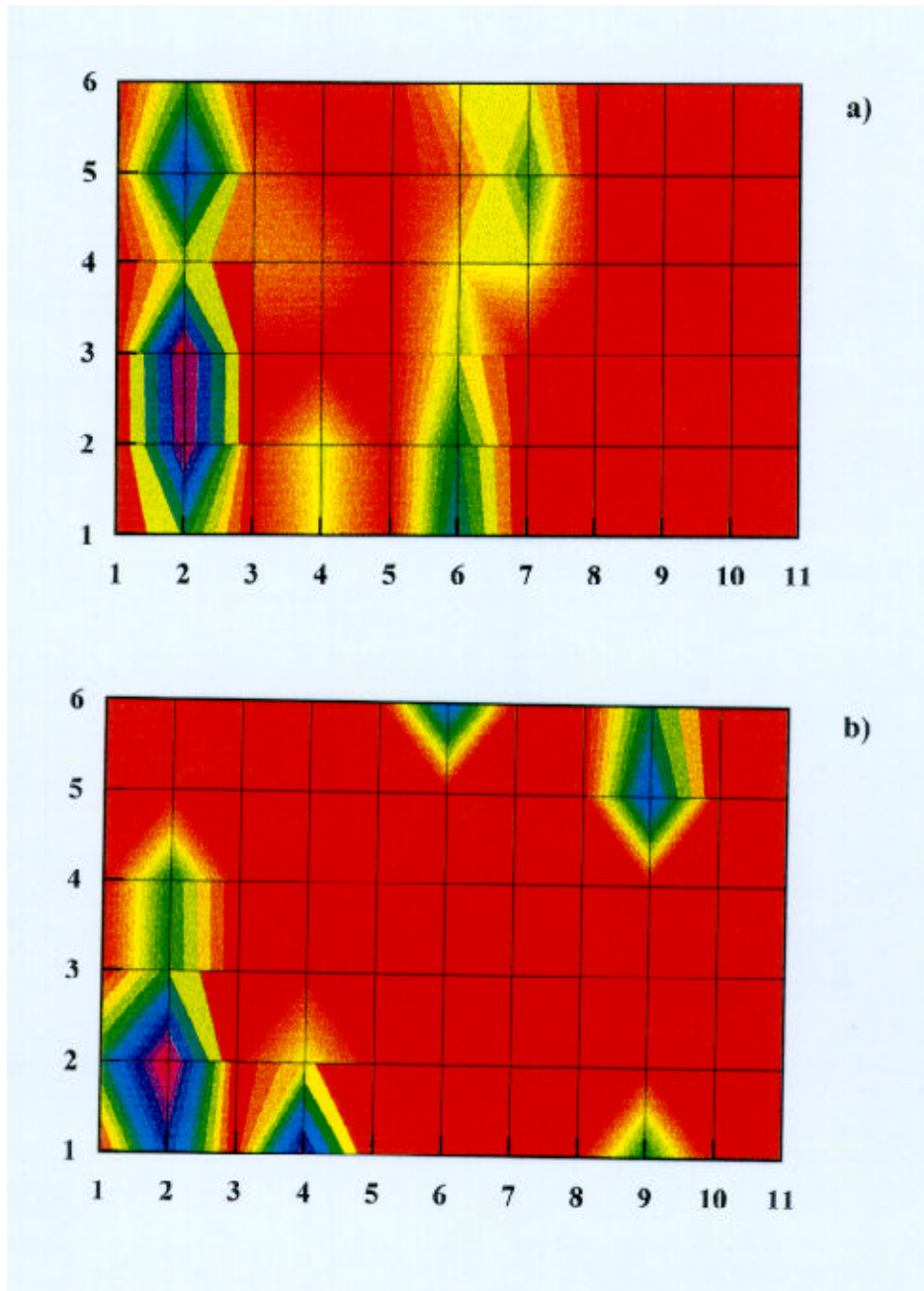


Figura 26.- “Perfil aromático” del pimiento tipo Padrón fresco triturado (a) y liofilizado (b).

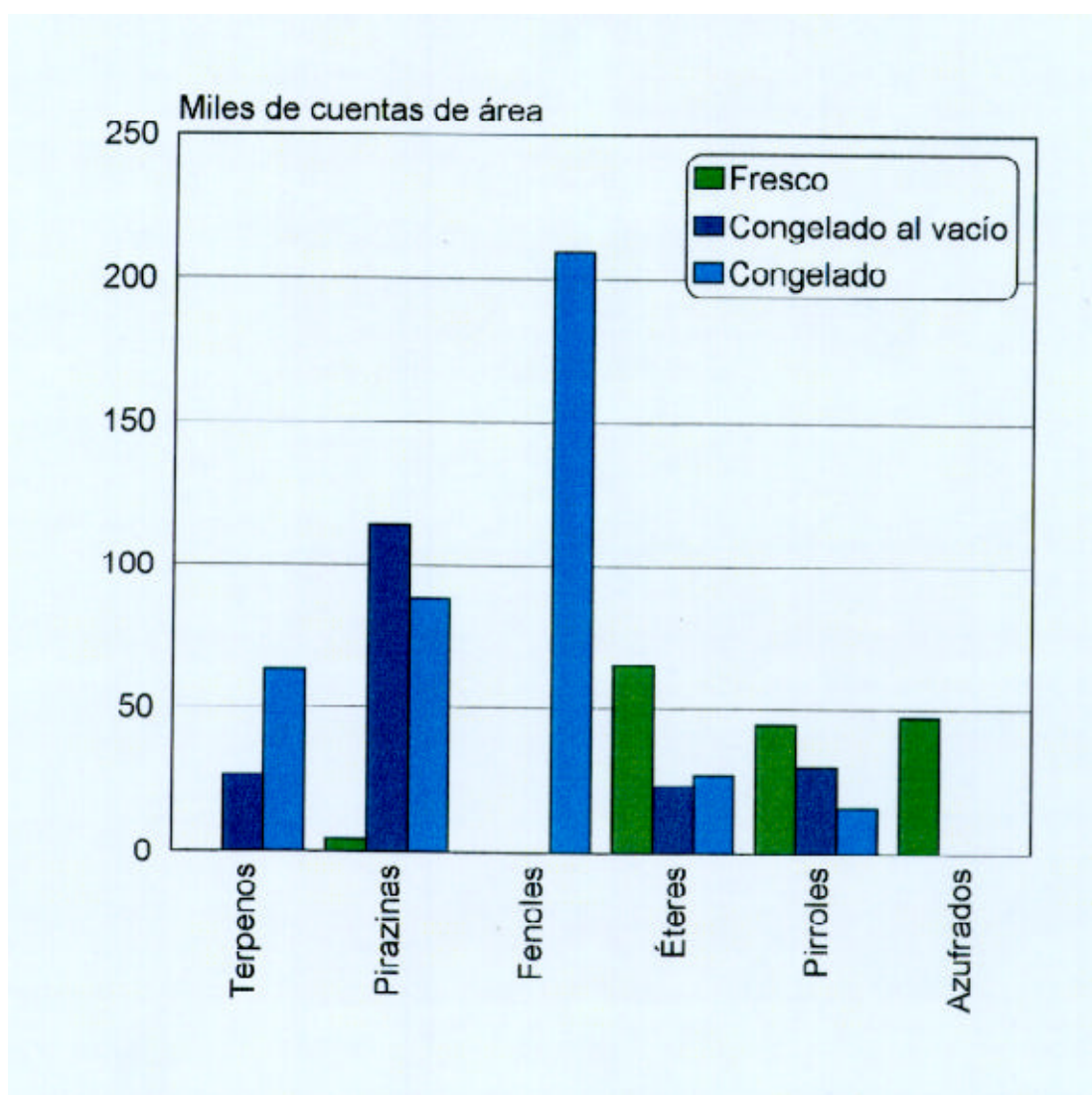


Figura 27.- Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco y congelado, con y sin vacío.

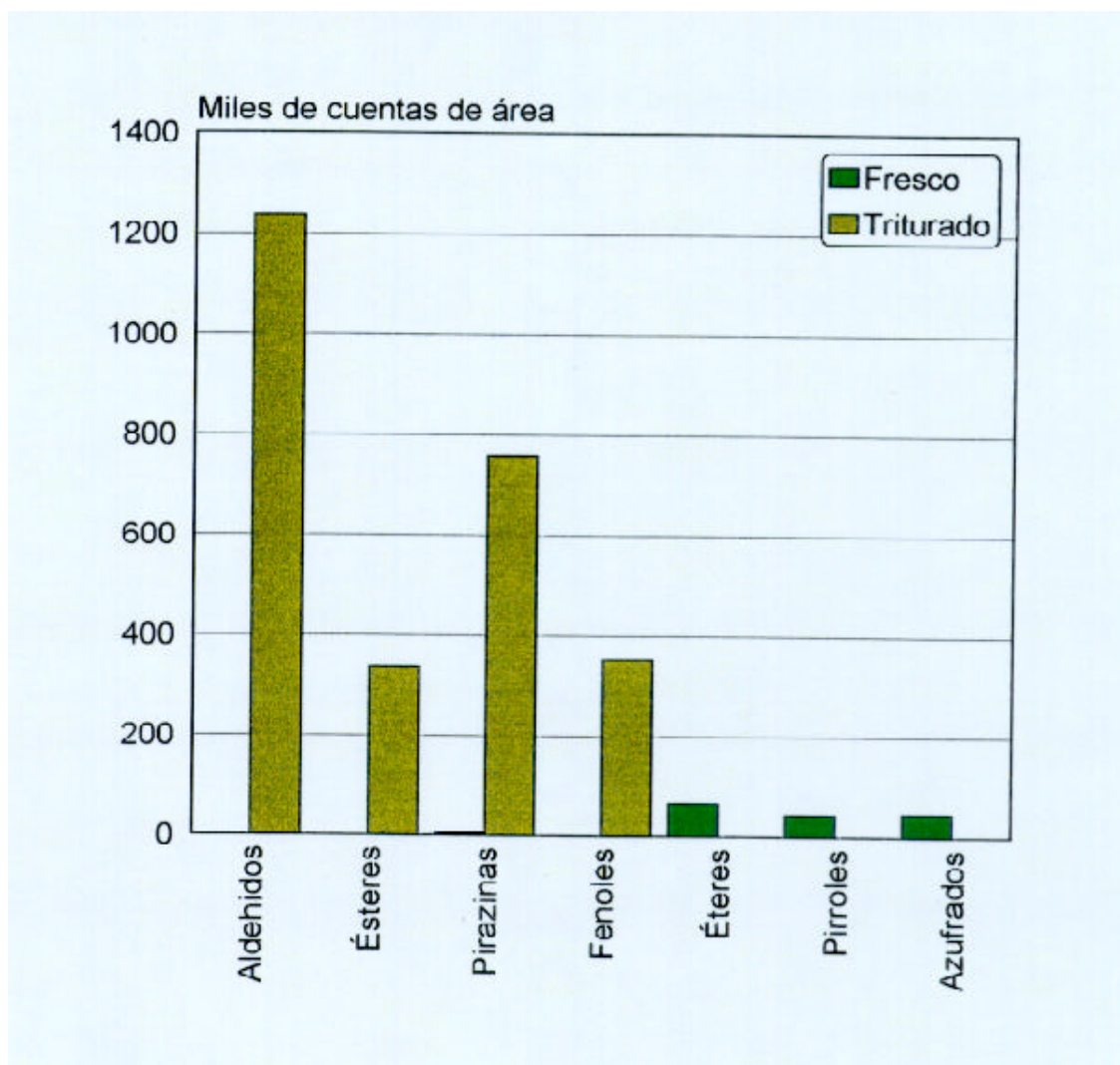


Figura 28.- Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco ( entero y triturado).

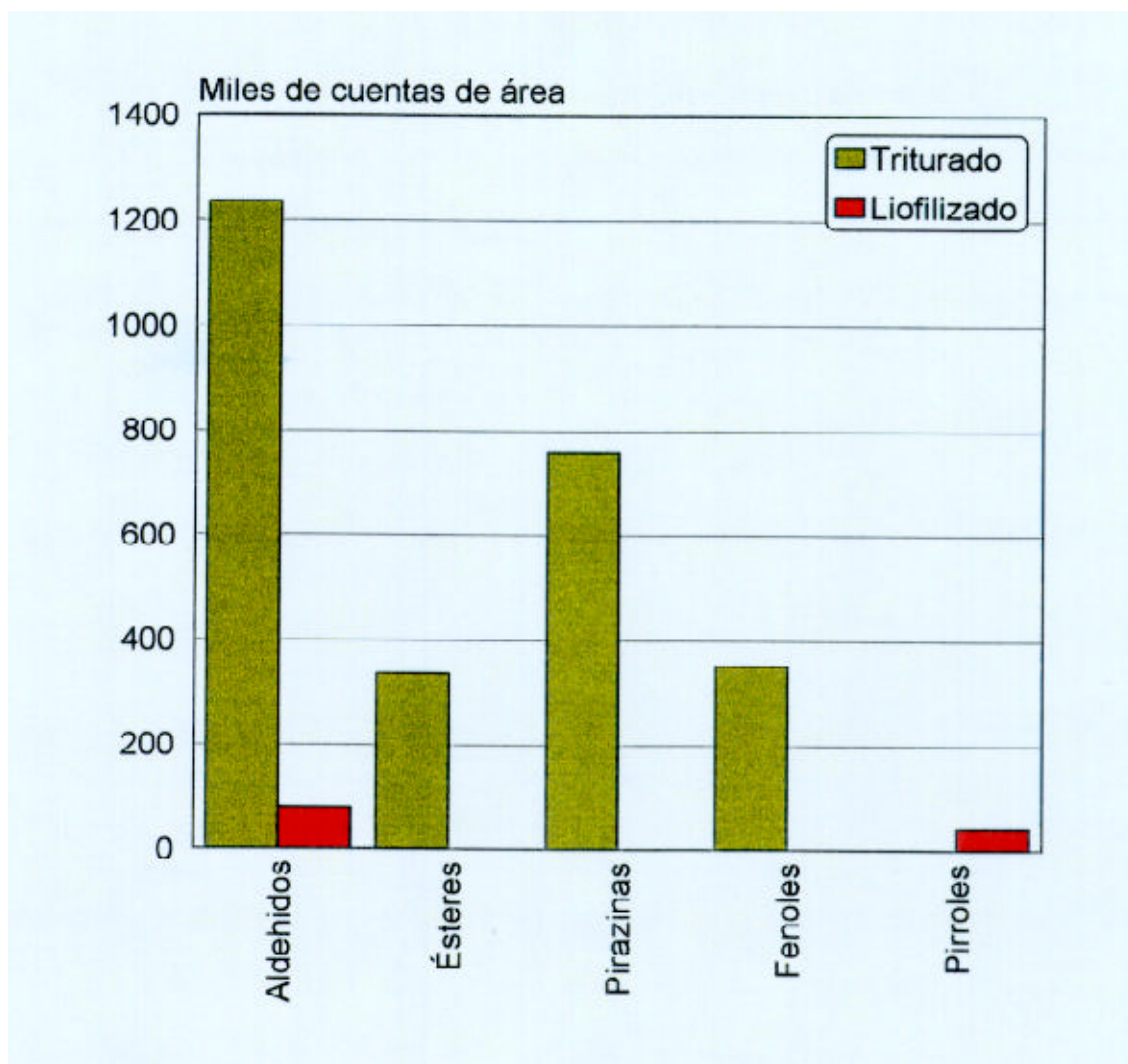


Figura 29.- Contenido global de compuestos volátiles en el pimiento tipo Padrón fresco (triturado) y liofilizado.

---

#### **4.3.3.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN CAPSAICINOIDES (Capsaicina y Dehidrocapsaicina) DURANTE LA COSECHA.**

La evolución del contenido en capsaicina y dehidrocapsaicina de los pimientos tipo Padrón durante los meses de cosecha se recoge en el trabajo publicado en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (López-Hernández y col., 1996 b).

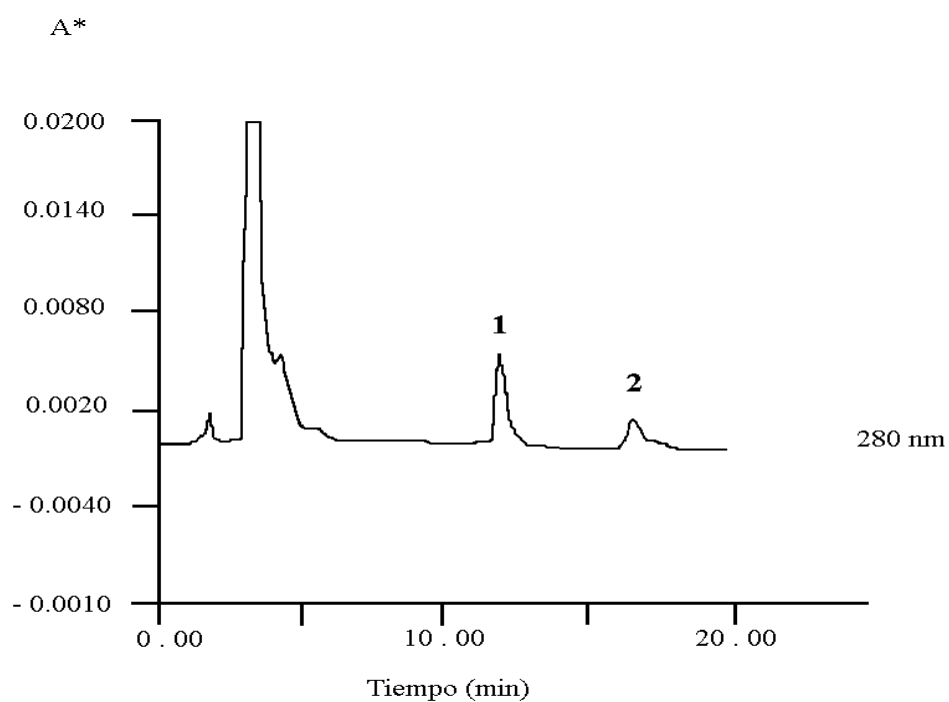
Los cromatogramas correspondientes a la mezcla de capsaicina y dehidrocapsaicina patrón y a una muestra de pimiento tipo Padrón se muestran en la Fig. 30a y b, respectivamente. En la Fig. 31 se recoge el espectro de la capsaicina.

Durante los meses de consumo del pimiento tipo Padrón (Junio-Septiembre) cuando aún no está maduro (tamaño entre 3 y 5 cm) y presenta un color verde, no se detectó capsaicina ni ninguno de sus homólogos. En cambio en el mes de octubre, coincidiendo con la madurez del fruto (7-11 cm. y aparición de color rojo en algunos frutos), sí se detectaron capsacinoides.

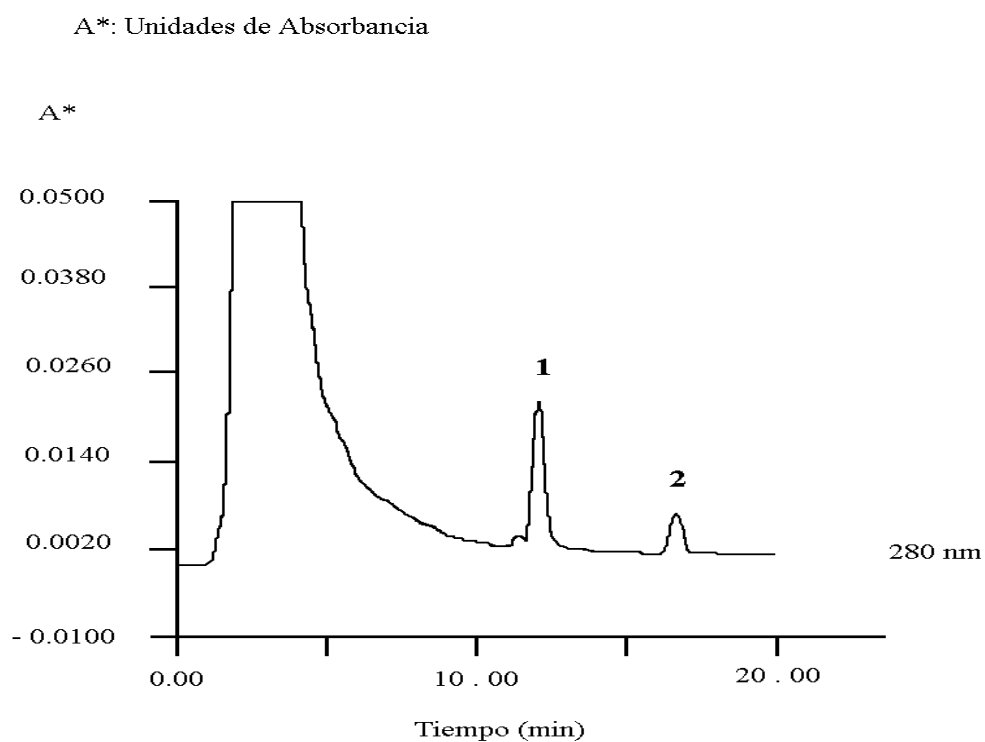
Durante la 1ª quincena de octubre la cantidad media de capsaicina y dehidrocapsaicina halladas en pimientos verdes fue de 1.14 y 0.49 mg/100g de muestra fresca respectivamente. Estas cantidades se vieron incrementadas notablemente en el caso de los pimientos rojos (5.12 y 6.89 mg/100 g de muestra fresca para capsaicina y dehidrocapsaicina respectivamente).

En la 2ª quincena de octubre el contenido de capsaicina no se vio modificado en pimientos verdes con respecto a la 1ª quincena pero la dehidrocapsaicina aumentó un 44% (0.87 mg/100 g de muestra fresca). Los valores de ambos capsacinoides en pimientos rojos fueron similares a los de la 1ª quincena (5.60 y 6.25 mg/100g de muestra fresca para capsaicina y dehidrocapsaicina respectivamente).

a)

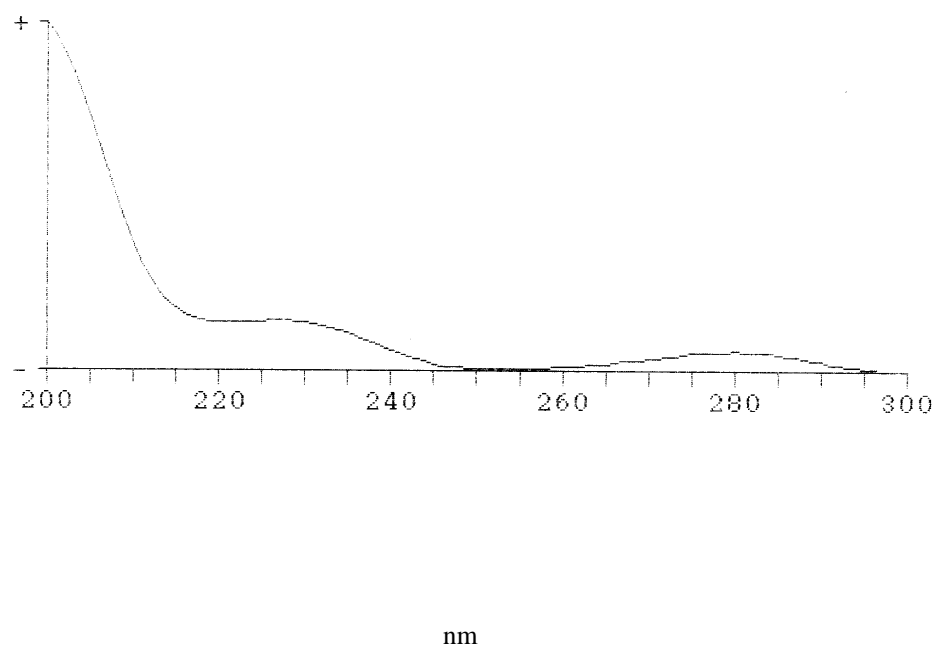


b)



A\*: Unidades de Absorbancia

**Figura 30.- Determinación de capsaicina y dehidrocapsaicina. (a) Cromatograma de una solución patrón de capsaicina (1) y dehidrocapsaicina (2), (b) Cromatograma de capsaicina y dehidrocapsaicina correspondiente a una muestra de pimientos tipo Padrón.**



**Figura 31.- Espectro UV-Vis de la Capsaicina.**

---

#### 4.3.4.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y VITAMINA C

La evolución de la vitamina C en pimientos tipo Padrón congelados en bolsas selladas manualmente y a vacío, ha sido objeto de una publicación en la revista *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Oruña-Concha y col., 1996 b), así mismo, la influencia del proceso de liofilización sobre el contenido en vitamina C en este tipo de pimiento se recoge en la revista *Deutsche lebensmittel-Rundschau* (González-Castro y col., 1996 d).

La evolución de la vitamina C en pimientos congelados, envasados con y sin sellado a vacío, y en pimientos liofilizados se recoge en la Fig. 32 (Tabla XII).

Se observa, en los pimientos congelados, que al cabo del 1<sup>er</sup> mes se pierde la práctica totalidad de la vitamina C (97 %), tanto si se han sellado a vacío como si no. En cambio, en el caso de los pimientos liofilizados, ya se pierde prácticamente la totalidad de dicha vitamina C en el proceso de liofilización, debido probablemente a su oxidación catalizada por el enzima ascorbato oxidasa, que existe en casi todas las hortalizas.

Para evaluar la duración de vida de los vegetales congelados y liofilizados pueden usarse como criterios pérdida del 50, 25 ó 10% de ácido ascórbico (Labuza, 1982). Adoptando el criterio menos estricto (50%), los pimientos crudos no son aceptables al mes de haber sido congelados, y los pimientos liofilizados tampoco lo son tras la liofilización.

La evolución de los ácidos málico, oxálico, quínico, cítrico y fumárico en pimientos tipo Padrón congelados en bolsas selladas manualmente y a vacío ha sido objeto de una publicación en la revista *Z Lebmns Unters For* (González-Castro y col., 1996 b).

Las Figs. 33, 34, 35, 36 y 37 (Tablas XIII, XIV, XV, XVI y XVII), recogen las modificaciones que experimentan los ácidos málico, oxálico, quínico, cítrico y fumárico en pimientos tipo Padrón congelados en bolsas selladas manualmente y a vacío, y liofilizados, respectivamente.

Estas figuras indican, en el caso de la congelación, que el modo de sellado tiene poca influencia en el contenido en ácidos orgánicos. Se observó al cabo del 1<sup>er</sup> mes de haber sido congelados, descenso de los ácidos málico, oxálico y cítrico (37, 53, y 67 % respectivamente), aumento del ácido fumárico que quintuplica su valor, y 73% de aumento del ácido quínico convirtiéndose en el ácido orgánico mayoritario del pimiento en estado congelado.



---

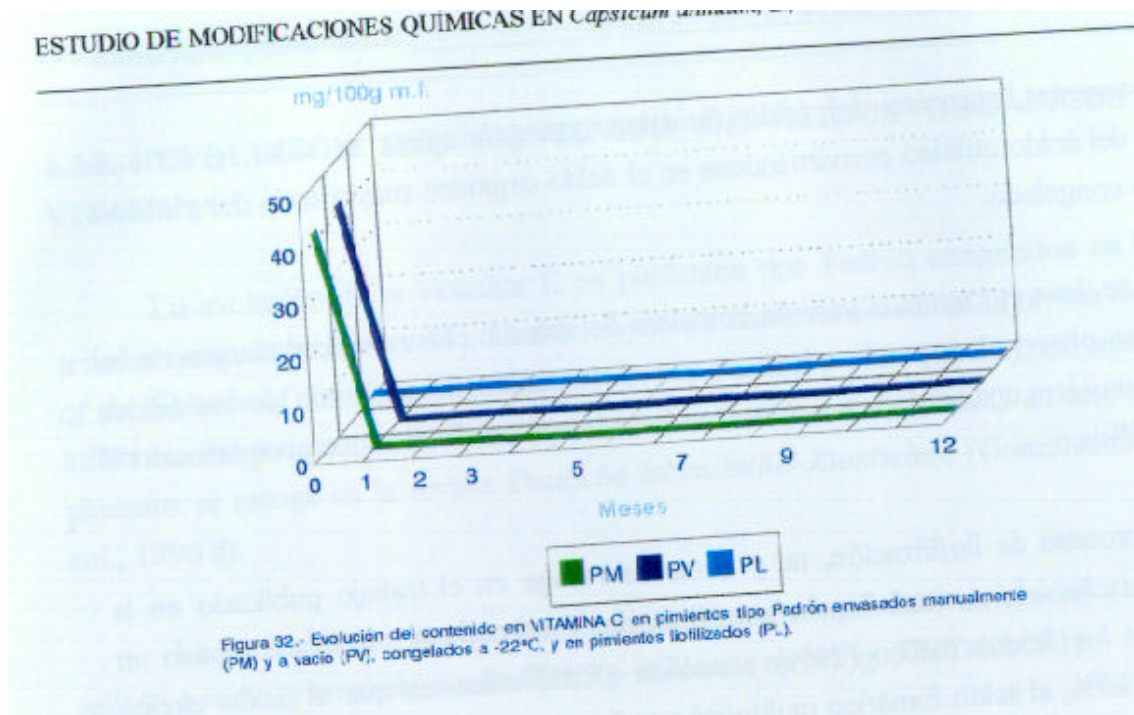
Si se tiene en cuenta el periodo completo del estudio (12 meses), al margen de las oscilaciones observadas, puede admitirse que el contenido de cada uno de los ácidos orgánicos muestra una tendencia a mantenerse con respecto al valor que presentan al 1<sup>er</sup> mes de análisis.

El proceso de liofilización, tal y como se recoge en el trabajo publicado en la revista *Deutsche lebensmittel-Rundschau* (González-Castro y col., 1996 d), supuso un descenso de los ácidos málico (20%) y oxálico (55%) mientras que el ácido cítrico aumentó un 80%, el ácido fumárico multiplicó por 6 su valor inicial y el ácido quínico, se vio incrementado en un 83%, convirtiéndose en el ácido orgánico más abundante en el estado liofilizado en el pimiento. Al margen de las fluctuaciones observadas, se puede decir que la tendencia general de todos los ácidos sugiere que hay pocos cambios durante el almacenaje con respecto al valor recién liofilizado.

El “Test de Diferencia entre Pares” en este caso reveló que en ningún ácido orgánico existían diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre el empaquetado manual y a vacío, sin embargo al comparar la congelación y la liofilización se vio que en todos los ácidos exceptuando el ácido quínico existían diferencias significativas, obteniéndose mejores resultados en el caso de la congelación.

La acidez total del pimiento tipo Padrón en estado fresco, expresada en mg de ácido málico/100 g de muestra fresca, fue de 674. Cuando se calculó la acidez total en las muestras congeladas se obtuvo un valor de 457. Por lo tanto, la acidez total disminuye un 32% con la congelación.

Esta disminución en el contenido en ácidos orgánicos alifáticos en las verduras en estado congelado y liofilizado con respecto al estado fresco va a tener repercusión en las características organolépticas (aroma y sabor) del producto. El descenso que experimenta el ácido oxálico en verduras congeladas y liofilizadas sugiere que el consumo de estos (y posiblemente otros) vegetales conservados deberían ser recomendados para personas con ciertos problemas fisiológicos (en particular, hiperoxaluria) caracterizadas por la formación de cálculos renales compuestos mayoritariamente de oxalatos.



**Tabla XII.-** Evolución del contenido en VITAMINA C en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a  $-22^{\circ}\text{C}$ , y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	41.7	41.7	0.47
1	0.48	0.30	0.44
2	0.49	0.47	0.69
3	0.48	0.44	0.57
5	0.14	0.40	0.49
7	0.26	0.28	0.34
9	0.31	0.27	0.69
12	0.53	0.60	0.74

**Tabla XIII.-** Evolución del contenido en ÁCIDO MÁLICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	227	227	182
1	138	146	128
2	201	198	155
3	157	157	145
5	152	164	140
7	201	193	135
9	168	167	163
12	177	182	188

**Tabla XIV.-** Evolución del contenido en ÁCIDO OXÁLICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	226	226	101
1	112	107	79.3
2	126	140	109
3	116	116	96.3
5	107	108	78.5
7	129	128	104
9	120	146	102
12	122	114	94.0

**Tabla XV.-** Evolución del contenido en ÁCIDO QUÍNICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	123	123	225
1	215	212	204
2	208	230	215
3	217	201	197
5	204	233	198
7	245	214	200
9	181	212	250
12	194	251	217

**Tabla XVI.-** Evolución del contenido en ÁCIDO CÍTRICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	63.1	63.1	113
1	18.4	23.0	39.0
2	24.5	24.9	76.5
3	36.1	29.7	116
5	34.8	34.0	133
7	31.2	35.7	27.3
9	21.5	15.4	14.8
12	14.3	29.1	77.8

**Tabla XVII.-** Evolución del contenido en ÁCIDO FUMÁRICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.37	0.37	2.33
1	2.38	1.91	1.28
2	2.05	1.78	1.19
3	1.97	1.47	1.18
5	1.84	2.26	1.12
7	5.51	4.68	2.29
9	1.55	1.92	1.41
12	2.05	1.92	1.20

#### **4.3.5.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN CARBOHIDRATOS (Azúcares solubles, Almidón, Pectinas y Fibra insoluble)**

El estudio de la evolución de los azúcares solubles, almidón, pectinas y fibra insoluble en pimientos tipo Padrón congelados en bolsas selladas manualmente y a vacío, ha sido objeto de una publicación en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (Oruña y col., 1996a).

Las Figs. 38 y 39 (Tablas XVIII y XIX) recogen respectivamente la evolución del contenido en fructosa y glucosa en pimientos congelados en bolsas selladas manualmente y a vacío. En ambos casos el contenido de ambos azúcares no se vio modificado durante los 12 meses que duró el ensayo.

Independientemente del tipo de empaquetado el almidón y la pectina no se vieron modificados durante el proceso de congelación (Figs. 40 y 41 respectivamnete) (Tablas XX y XXI). Por el contrario, el contenido en fibra insoluble (Fig. 42 y Tabla XXII), aunque inicialmente estable, aumentó hacia el 2º mes de congelación siendo este aumento más marcado en el caso del sellado a vacío (30%) que en el sellado manual (13%), manteniéndose estos valores prácticamente constantes durante los 12 meses de estudio.

Al comparar los dos tipos de empaquetado, aplicando el “Test de Diferencia entre Pares”, sólo se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para la fibra insoluble, encontrándose valores más altos en el empaquetado a vacío.

El estudio de la influencia de la liofilización sobre todos estos carbohidratos se recoge en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (González-Castro y col., 1996 d).

En el proceso de liofilización, los azúcares solubles (Figs. 41 y 42), la pectina (Fig. 44) y el almidón (Fig. 43) no se vieron afectados ni por el proceso en sí, ni durante su posterior almacenamiento, aunque en el caso de los azúcares puede apreciarse un ligero aumento en las muestras liofilizadas que puede relacionarse con una mayor extractabilidad química de los azúcares cuando se parte de muestra seca. Sin embargo, aunque la fibra insoluble no se vio afectada por el proceso de liofilización, al 3º mes de almacenamiento experimentó un incremento del 27 %, que se mantuvo durante los 12 meses de análisis.

**Tabla XVIII.-** Evolución del contenido en FRUCTOSA en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.582	0.582	0.700
1	0.670	0.632	0.780
2	0.580	0.629	0.770
3	0.635	0.636	0.740
5	0.638	0.645	0.680
7	0.666	0.618	0.690
9	0.667	0.575	0.650
12	0.633	0.607	0.720

**Tabla XIX.-** Evolución del contenido en GLUCOSA en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.683	0.683	0.790
1	0.724	0.711	0.810
2	0.607	0.697	0.800
3	0.678	0.700	0.750
5	0.637	0.663	0.660
7	0.692	0.623	0.670
9	0.729	0.645	0.690
12	0.657	0.690	0.730

**Tabla XX.-** Evolución del contenido en ALMIDÓN en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)

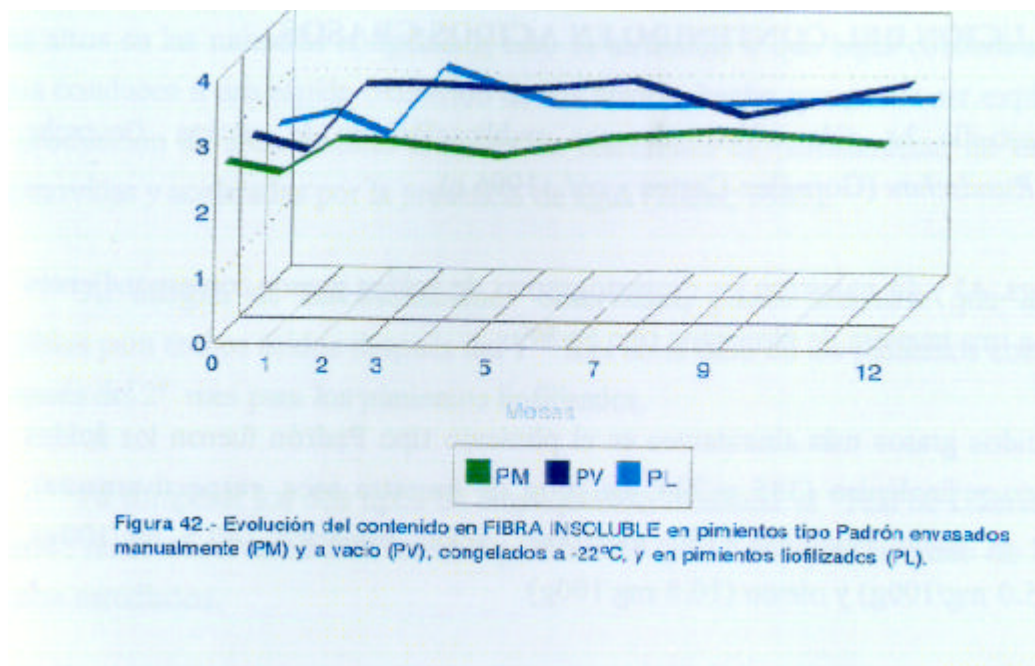
Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.21	0.21	0.22
1	0.20	0.20	0.32
2	0.17	0.20	0.23
3	0.26	0.21	0.22
5	0.23	0.15	0.23
7	0.26	0.21	0.27
9	0.22	0.19	0.22
12	0.23	0.17	0.28

---

**Tabla XXI.-** Evolución del contenido en PECTINAS en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	0.69	0.69	0.68
1	0.56	0.59	0.52
2	0.50	0.47	0.50
3	0.57	0.61	0.63
5	0.62	0.62	0.62
7	0.70	0.68	0.65
9	0.75	0.67	0.53
12	0.58	0.60	0.71





**Tabla XXII.-** Evolución del contenido en FIBRA INSOLUBLE en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C y en pimientos liofilizados. (g/100g m.f.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	2.58	2.58	2.36
1	2.42	2.37	2.56
2	2.94	3.39	2.23
3	2.92	3.41	3.28
5	2.73	3.36	2.74
7	3.03	3.51	2.73
9	3.15	2.98	2.79
12	2.97	3.49	2.86

---

#### 4.3.6.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS

Este estudio ha sido objeto de una publicación en la revista *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (González-Castro y col., 1996 c).

Las Figs. 43 y 44 muestran los cromatogramas de ácidos grasos correspondientes a un patrón y a una muestra de pimientos tipo Padrón.

Los ácidos grasos más abundantes en el pimiento tipo Padrón fueron los ácidos grasos linoleico y linolénico (385 y 244 mg/100g de muestra seca, respectivamente), seguidos por el ácido palmítico (150 mg/100g), ácido esteárico (40.5 mg/100g), araquídico (15.0 mg/100g) y oleico (10.8 mg/100g).

La evolución del contenido de los ácidos grasos sujetos a diferentes tratamientos son mostrados en las Figs. 45 (palmítico), 46 (esteárico), 47 (araquídico), 48 (oleico), 49 (linoleico) y 50 (linolénico), (Tablas XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII Y XXVIII, respectivamente).

Sobre el 1º mes de almacenamiento los ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico, araquídico) y monoinsaturados (oleico), descendieron considerablemente en los pimientos congelados independientemente del tipo de empaquetado, descenso que no fue observado en el caso de los pimientos liofilizados. Si se tiene en cuenta el período completo del estudio (12 meses) y al margen de las oscilaciones observadas, puede admitirse que existe una tendencia a mantenerse con respecto al valor que presentan al 1<sup>er</sup> mes de estudio.

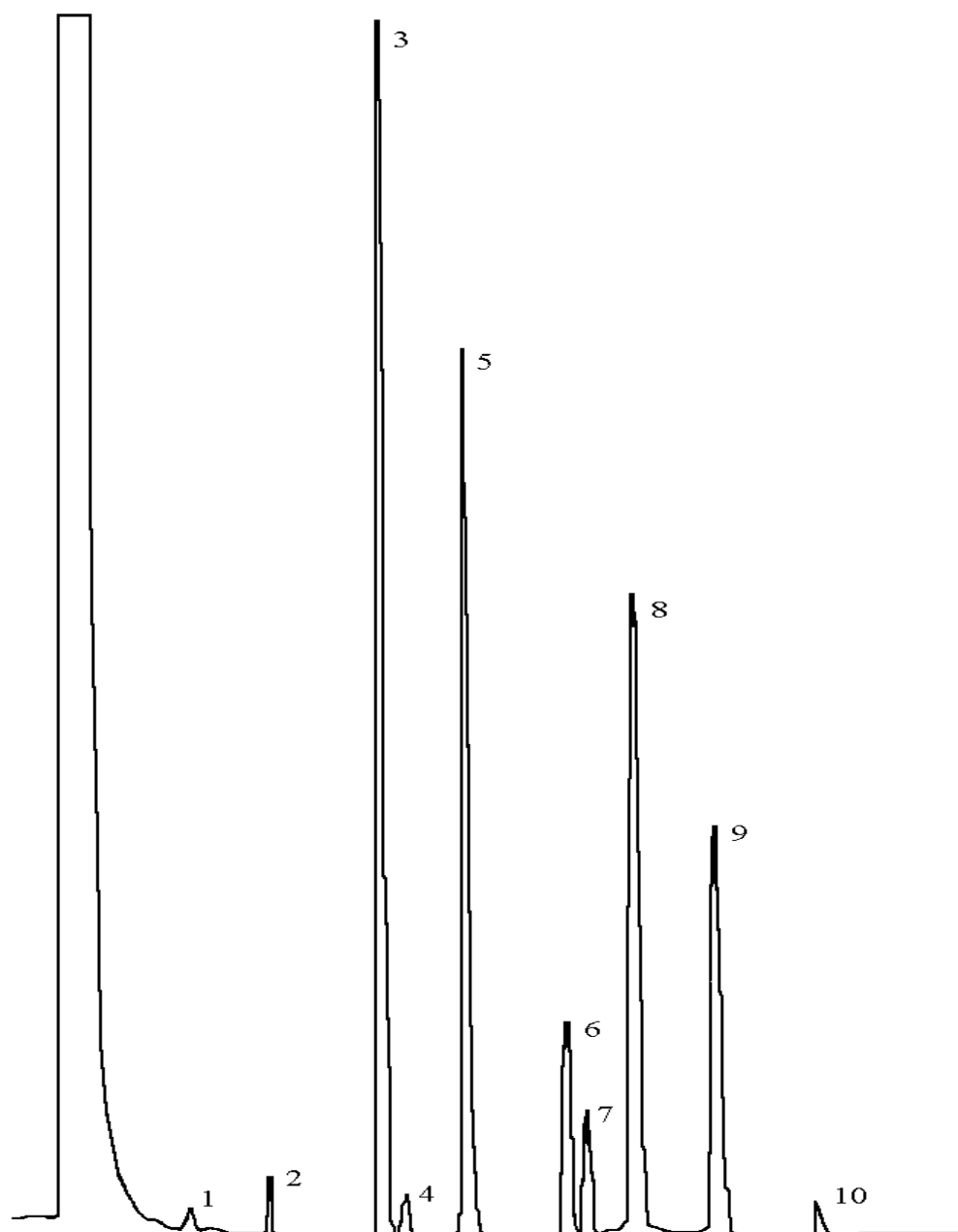
Independientemente del tipo de empaquetado, el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) disminuye un 13% durante el 1<sup>er</sup> mes de almacenamiento en pimientos congelados, descenso que no fue observado en los pimientos sometidos al proceso de liofilización. Por el contrario, en los pimientos liofilizados el contenido de ambos ácidos grasos descendió un 34 y 61% respectivamente, hacia el 2º mes de almacenamiento. Este descenso tan acusado del ácido linolénico respecto al linoleico se debe al mayor grado de insaturación del ácido linolénico (Belitz y Grosh, 1988).

En el análisis de los datos obtenidos para los ácidos grasos poliinsaturados se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la congelación y la liofilización de pimientos mediante el uso del "Test de Diferencia entre Pares", encontrándose valores más altos en las muestras congeladas; esto es atribuible a que bajas concentraciones de agua conducen a una rápida oxidación de los lípidos, hecho que puede ser explicado por la producción de antioxidantes a través de reacciones de pardeamiento no enzimático, promovidas y aceleradas por la presencia de agua (Karel, 1985).

---

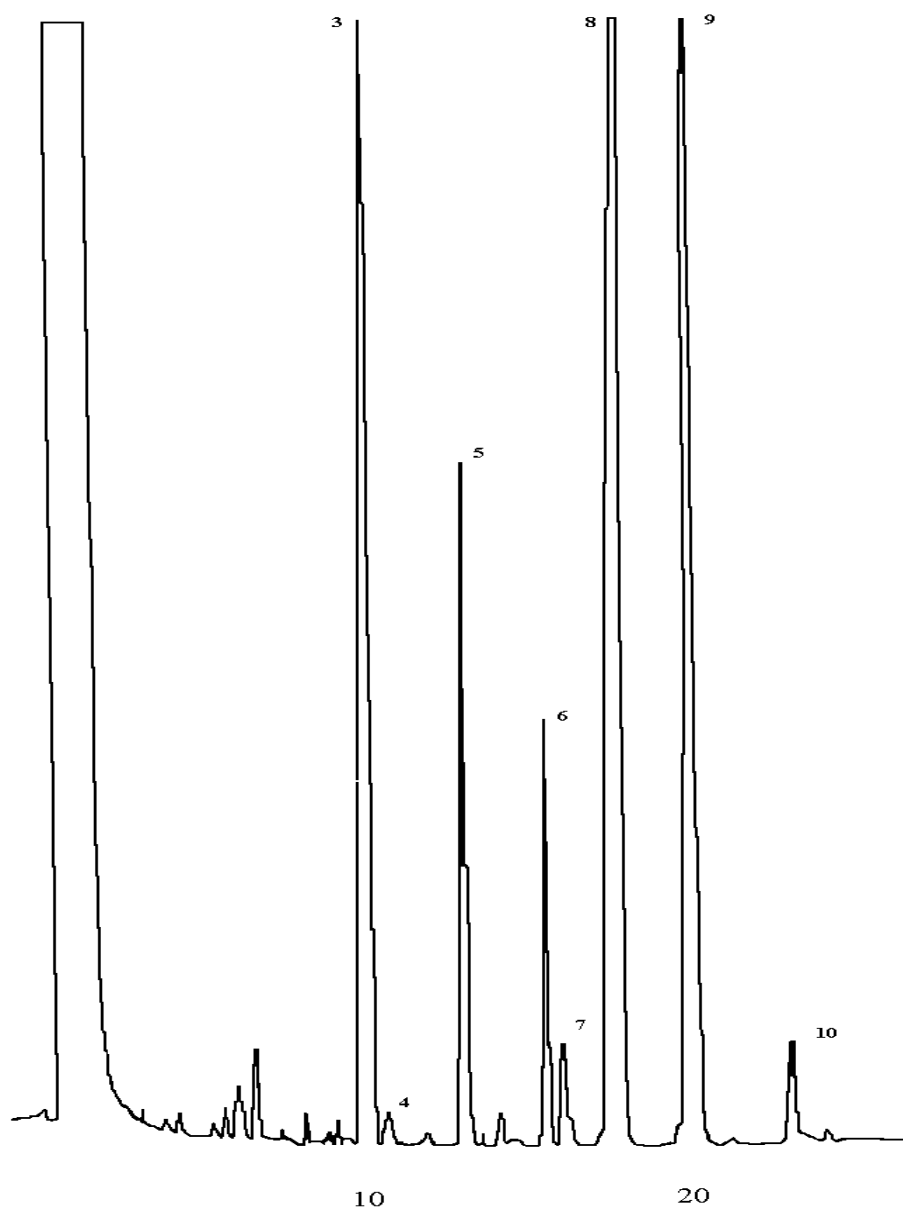
Al margen de las oscilaciones observadas, puede admitirse que hay pocos cambios para ambos ácidos después del 1<sup>er</sup> mes en el caso de los pimientos congelados y después del 2<sup>o</sup> mes para los pimientos liofilizados.

Al comparar los dos tipos de empaquetado mediante el “Test de Diferencia entre Pares”, no se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para ninguno de los ácidos grasos estudiados.



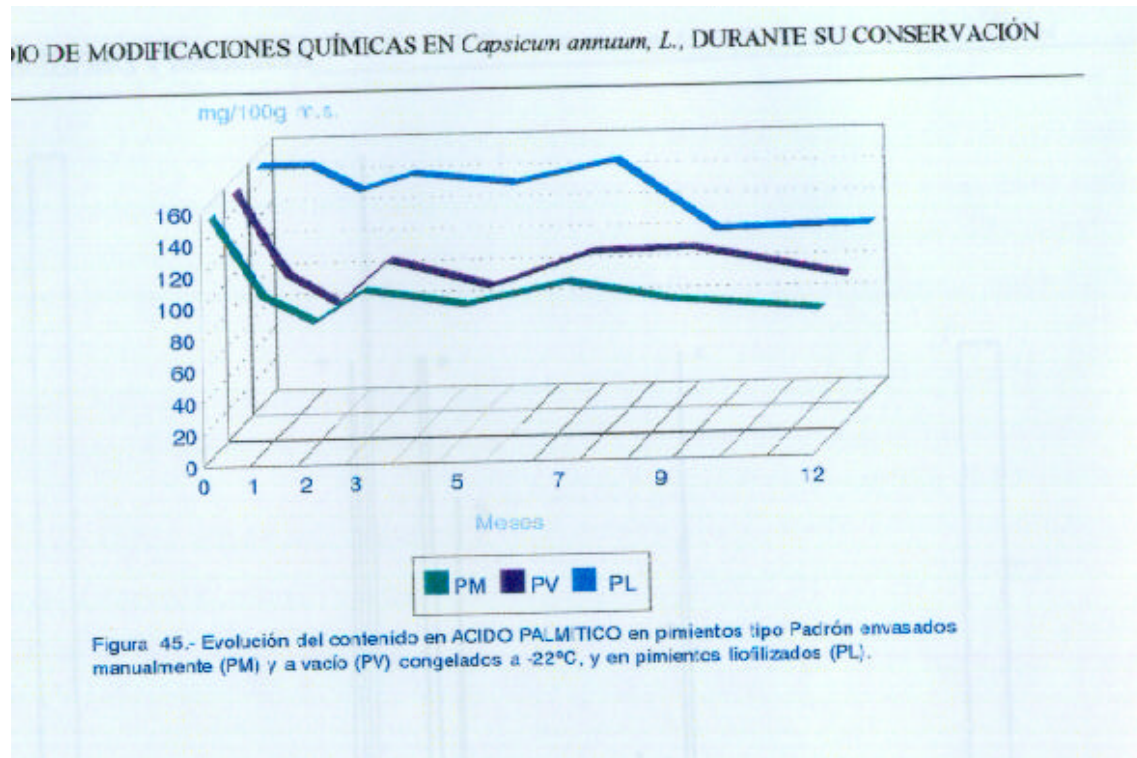
(1) Láurico, (2) Mirístico, (3) Palmítico, (4) Palmitoleico, (5) Heptadecanoico, (6) Estearico, (7) Oleico, (8) Linoleico, (9) Linolénico, (10) Aráquico.

Figura 43.- Cromatograma de una solución patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos.



(3) Palmítico, (4) Palmitoleico, (5) Heptadecanoico, (6) Esteárico, (7) Oleico, (8) Linoleico, (9) Linolénico, (10) Aráquico.

**Figura 44.- Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos grasos correspondiente a una muestra de pimiento tipo Padrón congelado manualmente.**



**Tabla XXIII.-** Evolución del contenido en ÁCIDO PALMÍTICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	150	150	150
1	99.5	96.9	150
2	82.7	78.3	134
3	102	105	144
5	91.9	87.4	136
7	105	108	150
9	93.5	109	105
12	85.6	90.6	107

**Tabla XXIV.-** Evolución del contenido en ÁCIDO ESTEÁRICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados . (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	40.5	40.5	40.5
1	32.4	32.2	40.5
2	26.7	27.0	43.5
3	34.7	37.2	47.0
5	27.9	28.1	45.0
7	24.3	28.0	46.7
9	31.2	27.5	48.8
12	30.6	30.6	47.2

**Tabla XXV.-** Evolución del contenido en ÁCIDO ARAQUÍDICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	15.0	15.0	15.0
1	13.1	13.3	14.8
2	10.8	11.5	15.3
3	14.1	14.8	16.2
5	10.1	9.21	17.5
7	13.1	12.0	12.5
9	11.6	15.0	12.2
12	12.6	13.6	17.2

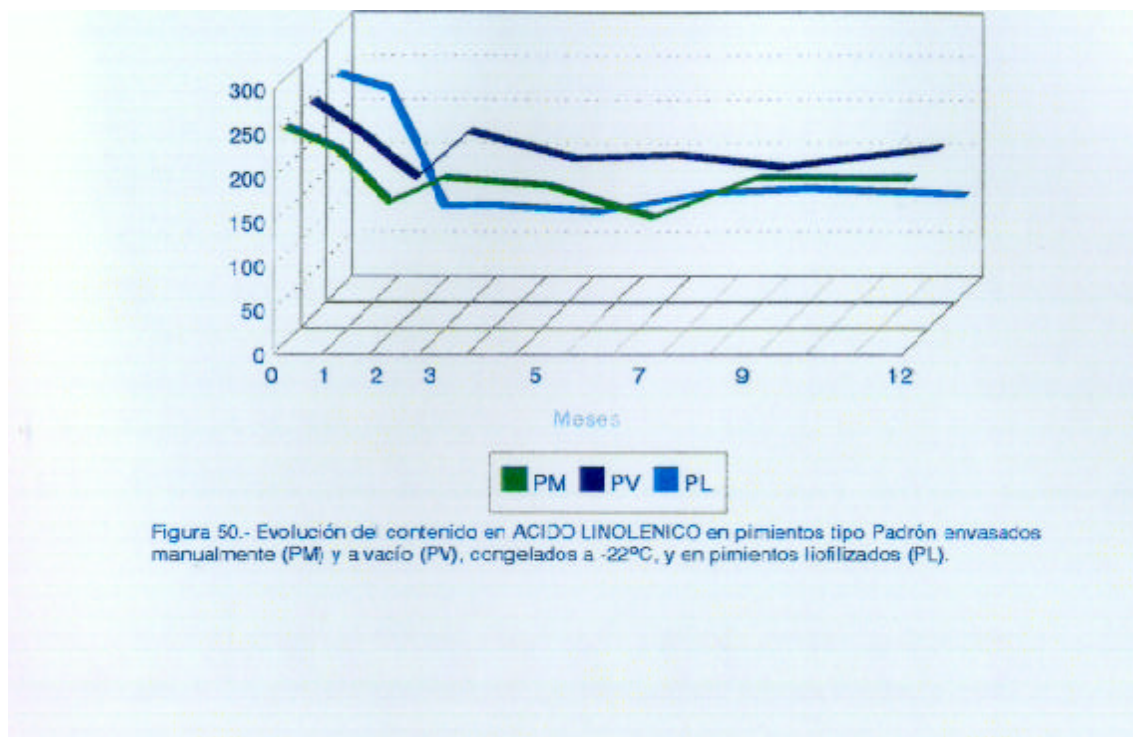
**Tabla XXVI.-** Evolución del contenido en ÁCIDO OLEICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	10.8	10.8	10.8
1	8.22	7.69	9.55
2	8.61	7.46	13.0
3	10.1	8.92	13.7
5	8.31	7.98	13.2
7	13.3	12.4	16.1
9	9.14	10.4	10.7
12	8.60	9.60	10.2

**Tabla XXVII.-** Evolución del contenido en ÁCIDO LINOLEICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	385	385	385
1	341	331	382
2	273	260	256
3	338	347	268
5	307	309	273
7	309	343	246
9	299	325	242
12	286	291	257





**Tabla XXVIII.-** Evolución del contenido en ÁCIDO LINOLÉNICO en pimientos envasados manualmente y a vacío, congelados a -22°C, y en pimientos liofilizados. (mg/100g m.s.)

Tiempo (meses)	Pimientos congelados envasados sin vacío	Pimientos congelados envasados con vacío	Pimientos Liofilizados
0	244	244	244
1	219	205	227
2	159	157	94.7
3	186	209	95.0
5	178	178	88.4
7	142	182	109
9	187	168	114
12	185	191	107

## **5. CONCLUSIONES**

---

## 1.- SOBRE LOS MÉTODOS PUESTOS A PUNTO

1) Se propone un método de HPLC con detector UV-VIS para la determinación de la capsaicina y dehidrocapsaicina. Tras realizar una extracción a reflujo con acetona, la separación de dichos capsaicinoides se realizará utilizando una columna C8 como fase estacionaria y una mezcla de metanol:agua (65:35) como fase móvil, a un flujo de 1 ml/min. La detección se llevó a cabo en un detector UV-VIS a 280 nm. Las precisiones del método (RSD) fueron de 2.33 y 1.02 para la capsaicina y dehidrocapsaicina, respectivamente. En el estudio de la recuperación se obtuvo un valor de 97.4%, siendo el límite de detección para la capsaicina de 0.89 µg/mL y de 0.57 µg/mL para la dehidrocapsaicina.

2) Se propone un método de cromatografía de gases con detector de masas para la elaboración del perfil aromático del pimiento tipo Padrón. Después de su extracción en un sistema de purga térmica mediante N<sub>2</sub>, los compuestos volátiles quedan atrapados en los cartuchos de adsorción y a continuación se someten a una desorción térmica guiada por microondas. La separación se llevará a cabo en una columna DB-5, utilizando nitrógeno como gas portador a un flujo de 2.43 ml/min.

3) Se propone un método de HPLC para la determinación de los ácidos orgánicos (oxálico, quínico, málico, cítrico y fumárico) y de la vitamina C. La extracción se realiza con ácido metafosfórico y la separación tiene lugar en una columna C18 a un flujo de 0.5 mL/min. La detección es en la región del ultravioleta: 215 nm para los ácidos quínico, málico, cítrico y fumárico, y 245 nm para el ácido oxálico y la vitamina C. Las precisiones del método (RSD) estuvieron en el rango de 1.70- 3.93.

## 2.- CON RELACIÓN A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

Después del agua, la fibra insoluble fue el componente mayoritario de los pimientos tipo Padrón (2.2 g/100g de muestra fresca). Respecto a los azúcares solubles, el contenido en glucosa fue superior a la fructosa, no detectándose presencia alguna de sacarosa. El ácido orgánico mayoritario fue el ácido málico (208 mg/100g de muestra fresca), encontrándose la vitamina C en muy pequeña cantidad (24 mg/100g de muestra fresca). Finalmente, la clorofila *a* (7.9 mg/100g de muestra fresca) predominó sobre el resto de los pigmentos responsables del color en esta especie del género *capsicum*.

---

### 3.- CON RESPECTO A LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

1) La evolución de las clorofilas y de los carotenoides en pimientos tipo Padrón congelados, envasados con y sin sellado a vacío, fue la de mantenerse con respecto a su valor inicial durante los 12 meses que duró el estudio. En cambio, el proceso de liofilización supuso un descenso de todos ellos, descenso que se vio acentuado en el 1<sup>er</sup> mes de almacenamiento para la clorofila a y la luteína en un 80 y 26% respectivamente, mientras que el b-caroteno acusó una disminución del 62% en su 2<sup>o</sup> mes de almacenamiento.

2) En la elaboración del perfil aromático del pimiento de Padrón, el número de compuestos volátiles identificados es muy elevado, los cuales difieren según sea el tratamiento previo de la muestra (entera o triturada) así como el tratamiento de conservación al que se someta (congelación, con y sin vacío, y liofilización). Analizados los resultados obtenidos puede concluirse que en principio sólo puede hablarse de un “perfil aromático característico” para las muestras analizadas en fresco, ya sean enteras o trituradas, y para las muestras liofilizadas, si bien en las muestras congeladas, independientemente del tipo de envasado, dicho perfil es bastante heterogéneo.

3) Durante los meses de máximo consumo de los pimientos tipo Padrón (Julio-Septiembre) no se detectaron niveles apreciables de capsaicinoides. Sin embargo, durante el mes de Octubre, coincidiendo con la madurez del fruto, se encuentran valores de 56 y 69 mg/Kg de muestra fresca para la capsaicina y dehidrocapsaicina respectivamente.

4) Los procesos de congelación, con y sin sellado a vacío, así como la liofilización supusieron para la vitamina C una pérdida total de la misma, siendo más incipiente en la liofilización. Para el resto de los ácidos, un mes después de haber sido congelados e independientemente del tipo de sellado, se aprecia un descenso del 37, 53 y 67% para los ácidos málico, oxálico y cítrico, respectivamente, mientras que el ácido quínico experimenta un aumento del 73% y el ácido fumárico quintuplica su valor. La liofilización supuso, como hecho a destacar, un aumento importante en el contenido en ácido cítrico (80%) influyendo en el resto de los ácidos de forma similar a como lo hizo la congelación. Estos valores tenderán a mantenerse durante los 12 meses de estudio.

5) Los azúcares solubles encontrados en el pimiento tipo Padrón (fructosa y glucosa), así como el almidón y la pectina, no sufrieron modificación alguna en los

---

procesos de congelación, con y sin sellado a vacío, y liofilización a los que fueron sometidos. La fibra, en cambio, experimentó un aumento hacia el 2º mes de congelación, siendo éste más acusado con el sellado a vacío (30%), y muy similar al detectado al 3<sup>er</sup> mes de haberse liofilizado (27%), valores estos que permanecerán prácticamente constantes hasta el final del estudio.

6) Con la liofilización, los ácidos grasos saturados (palmítico, esteárico y araquídico) y monoinsaturados (oleico), presentes en el pimiento tipo Padrón, prácticamente se mantuvieron estables a lo largo del estudio, si bien descendieron considerablemente al 1<sup>er</sup> mes de haber sido congelados, presentando en este caso una tendencia a mantenerse con respecto a éste valor. Por su parte, el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico), disminuye al 1<sup>er</sup> mes con la congelación y más acusadamente al 2º mes con la liofilización, a partir de los cuales mostrarán una tendencia a mantenerse durante los meses de estudio.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AACC. American Association of Cereal Chemists (1984). 8th ed. St Paul, MN.

ACS. (1980). Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* 52, 2242.

Acree, T.E.; Barnard, J. y Cunningham, D.G. (1984). A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* 14, 273-286.

Adrian, J. y Frangne, R. (1990). *La Ciencia de los Alimentos de la A a la Z*. Ed. Acribia, S.A.

Al-Hasani, S.M.; Hlavac, J. y Huntsman, M.A. (1993). Simple method for determination of dietary fiber in frozen foods. *J. AOAC International* 76(5): 1014-1016.

Alberola, J. y Izquierdo, L. (1979). La fracción aromática del zumo de naranja. I. Análisis por métodos sensoriales y químicos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 19(2), 190-202.

Anderson, L.; Dibble, M.V.; Turkki, P.R.; Mitchell, H.S. y Rynbergen, H.J. (1987). *Nutrition in Health and Disease*. Interamericana, Mexico.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th edn. Virginia.

Aparicio-Cuesta, M. P. y García-Moreno, C. (1988). Quality of frozen cauliflower during storage. *J. Food Sci.*, 53(2): 491-493.

Arribas, A.; Revilla, G.; Zarra, Z. y Lorences, E.P. (1991). Changes in cell wall polysaccharides during the growth of *Phaseolus vulgaris* leaves. *J. Experim. Botany*, 42 (242): 1181-1187.

Badui Dergal, S. (1981). *Química de los alimentos*. Ed. Alhambra Mexicana, Mexico. 1ª edn.

Bakir, H.M.; Melton, S.L. y Wilson, J.L. (1993). Fatty acid composition, lipids and sensory characteristics of white amur (*Ctenopharyngodon idella*) fed different diets. *J. Food Sci.* 58(1): 90-95.

Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M.; Shaw, P.E. y Burns, J.K. (1995). Effect of coatings and prolonged storage conditions on fresh orange flavor volatiles, degrees brix and ascorbic acid levels. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1321-1323.

- Barbeni, M., Guarda, P. A., Villa, M., Cabella, P. Pivetti, F. y Ciaccio, F. (1990). Identification and sensory analysis of volatile constituents of babaco fruit (*Carica pentagona* Heilborn). *Flavour and Fragrance Journal*. Vol.5, 27-32.
- Barron, D. (1991). HPLC using diol-bonded silica, an alternative to silical gel in the prefractionation of aroma extracts. *Z Lebensmittel Unters For.*, 193: 454-459.
- Bartolomé A.P.; Rupérez, P. y Fúster, C. (1995). Pineapple fruit: morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of Red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chem.*, 53: 75-79.
- Batisse, C.; Fils-Lycaon, B. y Buret, M. (1994). Pectin changes in ripening cherry fruit. *J. Food Sci.*, 59(2): 389-393.
- Bayley, L. M. (1964). Manual of Cultivated plants. The McMillan Company, New York.
- Belitz, H. D. y Grosch, W. (1988). Química de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, 2ª edn.
- Bennet, D. J. y Kirby, G.W. (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc., C*, 442.
- Birch, G.G. (1985). Analysis of Food Carbohydrate. Ed. Elsevier Science Publishing, Londres.
- Boehringer Mannheim. (1995). Methods of Enzymatic BioAnalysis and Food Analysis. Germany.
- Boletín Oficial del Estado nº 228 de 23 de septiembre de 1983. Orden de la Presidencia de Gobierno del 12 de septiembre por la que se aprueba La Norma de Calidad para pimientos frescos destinados al comercio interior.
- Brunke, E. J.; Mair, P.; y Hammerschmidt, F.J. (1989). Volatiles from naranjilla fruit (*Solanum quitoense* Lam.). GC-MS analysis and sensory evaluation using sniffing GC. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 746-748.
- Buss, D.; Tyler, H.; Barber, S. y Crawley, H. (1987). Manual of Nutrition. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Buttery, R. G., Donald J.S. y Ling, L. C. (1994). Studies on flavor volatiles of some sweet corn products. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 791-795.
- Código Alimentario Español. (1980). Colección de textos legales del BOE. Madrid.
- Coulter, T.P. (1984). ALIMENTOS: Química de sus Alimentos. Ed. Acribia, S.A.



- Crombie, L., Dandegoanker, S. H. y Simpson, K. B. (1955). Amides of vegetable origin (VI). Synthesis of capsaicin. *J. Chem. Soc.*, 1025.
- Chaitor, J.P. (1987). Analysis of fatty acids in lipids by HPLC. *Food Chem.* 23: 19-27.
- Chalchat, J. C., Garry, R. Ph. et Michet, A. (1988). Dosage de la capsaïcine et de la dihydrocapsaïcine dans le jus de capsicums. *Parfums, cosmétiques, arômes*, 84, 69-75.
- Chen, B.H.; Peng, H.Y. y Chen, H.E. (1995). Changes of carotenoids, color and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1912-1918.
- Chen, B.H. y Yang, S.H. (1992). An improved analytical method for the determination of carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds. *Food Chem.* 44:61-66.
- Chitwood, R. L., R. M. Pangborn, y W. Jennings (1983). GC/MS and sensory analysis of volatiles from three cultivars of capsicum. *Food Chem.*, 11: 201-216.
- De La Plaza, J. L. (1990). Refrigeración de vegetales. Índice de madurez. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 3: 125-132.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº 40/34 de 11 de Febrero de 1989. Directiva del Consejo de 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los alimentos ultracongelados destinados a la alimentación humana.
- Diem, K. y Lenter, C. (1975). Tablas científicas. 7ª ed. Barcelona. Documento Geigy.
- Dirinck, P. J., Schreyen, L. y Schamp, N. M. (1989). Aroma quality evaluation of tomatoes, apples and strawberries. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 759-763.
- Esteve, M.J.; Farré R. y Frígola, A. (1995 a). Changes in ascorbic acid content in green asparagus during the harvesting period and storage. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2058-2061.
- Esteve, M.J.; Farré R.; Frígola, A.; López, J.C.; Romera, J.M.; Ramírez, M. y Gil, A. (1995 b). Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas. *Food Chem.*, 52: 99-102.
- Feinberg, M.; Favier, J-C. y Ireland-Ripert, J. (1991). Répertoire Général des Aliments. Ed. Inra, Paris.

Fischer, M. y Amado, R. (1994 a). Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 1: Analysis of the alcohol-insoluble residue. *Carbohydr. Polym.*, 25: 161-166.

Fischer, M.; Arrigoni, E. y Amado, R. (1994 b). Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydr. Polym.*, 25: 167-175.

Fuleki, T.; Pelayo, E. y Palabay, R.B. (1995). Carboxylic acid composition of varietal juices produced from fresh and stored apples. *J. Agric. Food Chem.* 43: 598-607.

García-Villanova, R. y Ruiz, M.D. (1988). Nota de estudio comparativo de métodos de desecación y tiempo de extracción de grasa para aguacates de la variedad "red". *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28 (1), 145-150.

Garrote, R.L.; Silva, E.R. y Bertone, R.A. (1989). Effect of surface freezing on ascorbic acid retention in water blanched potato strips. *J. Food Sci.*, 54(4): 1090-1091.

Gómez Bárez, J.A.; Sánchez Pérez, A. y Hernández Méndez, J. (1987). Valoración potenciométrica de citrato mediante un electrodo de amalgama de cobre. I. Estudio del método. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 27(4): 556-562.

Gómez, E.; Ledbetter, C.A.; y Preston, L.H. (1993). Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1669-1676.

González, M.V.; Lage, M.A. y Paseiro, P. (1995). Time-dependence of physico-chemical characteristics of kiwifruit between fruitset and harvest in Galicia (N.W. Spain). *J. Hort. Sci.* 70(2): 297-301.

González-Castro, M.J.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J.; Oruña-Concha, M.J.; y Vázquez-Blanco, M.E. (1996, a). "Separation of neutral lipid classes in green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) by HPLC". *Journal of Chromatogr. Sci.*, Vol. 34 (4), pp:199-201.

González-Castro, M.J.; Oruña-Concha, M.J.; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, b). Effects of freezing on the organic acid content of frozen green beans and Padrón peppers. *Z. Lebensmittel-Unters. For.* En Prensa.

González-Castro, M.J.; Oruña-Concha, M.J.; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, c). Effects of freezing and freeze-drying on the fatty acid content of Padrón type peppers. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* En Prensa.

- González-Castro, M. J.; Oruña-Concha, M.J; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, d). "Effects of freeze-drying on the compositions of green beans and Padrón peppers". *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. En Prensa.
- Granado, F.; Olmedilla, B.; Blanco, I. y Rojas-Hidalgo, E. (1992). Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2135-2140.
- Greenway, G. y Kometa, N. (1995). The determination of sugars in beverages and medicines using on-line dialysis for sample preparation. *Food Chem.*, 53: 105-110.
- Ha, Y.W. y Thomas, R.L. (1988). Simultaneous determination of neutral sugars and uronic acids in hydrocolloids. *J. Food Sci.*, 53(2): 574-577.
- Halvarson, H. y Alstin, F. (1984). Dietary fiber determination methods. *Cereal Foods World*. 29(9): 571-574.
- Harris, R.W.C.; Key, T.J.A.; Silcocks, D.B. y Wald, N.J. (1991). A case-control study of dietary carotene in men with lung cancer and in men with other epithelial cancers. *Nutr. Cancer*, 15: 63-68.
- Hawthorn, J. (1983). Fundamentos de Ciencia de Los Alimentos, de. S.A. Acribia, Zaragoza.
- Heinonen. M.I.; Ollilainen, V.; Linkola, E.K.; Varo, P.T. y Koivistoinen, P.E. (1989). Carotenoids in finnish foods: vegetables, fruits and berries. *J. Agric. Food Chem.* 37: 655-659.
- Helser, T.L. (1995). Improving a microscale vitamin C laboratory. *J.Chem. Educ.*, 72(1): A10-A11.
- Iwai, K., Suzuki, T. y Fujiwake, H. (1979). Simultaneous microdetermination of capsaicin and its four analogues by using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 172, 303-11.
- Jurenitsch, J. y Leinmuller, R. (1980). Quantification of nonylic acid vanillylamide and other capsaicinoids in the pungent principle of *capsicum* fruits and preparations by gas liquid chromatography on glass capillary columns. *J. Chromatogr.*, 189, 389-401.
- Karel, M. (1985). Enviromental effects on chemical changes in foods. Recogido en "Chemical Changes in Food during Processing" por los autores Richardson, T. y Finley, J.W. De. The Avi Publishing Company, Conecticut.

- Kawada, T., Watanabe, T., Katsura, K. et al. (1985). Formation and metabolism of pungent principle of capsicum fruits. *J. Chromatogr.*, 329, 99-105.
- Kerrola, K., Gambalosi, B., y Kallio, H. (1994). Volatile components and odor intensity of four phenotypes of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 42, 776-781.
- Khaled, M. Y., Anderson, M. R., y McNair, H. M. (1993). Micellar electrokinetic capillary chromatography of pungent compounds using simultaneous on-line ultraviolet and electrochemical detection. *J. Chromatogr. Sci.* 31, 259-64.
- Kozar, S.; Bujak, A.; Eder-Trifunovic, J y Kniewald, G. (1988). Determination of L-ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables by differential pulse polarography. *Fresenius Z Anal Chem.*, 329: 760-763.
- Kuti, J.O. (1992). Growth and compositional changes during the development of prickly pear fruit. *J. Hort. Sci.*, 67(6): 861-868.
- Labuza, T. P. (1982). Shelf-life Dating of Foods. Food & Nutrition., 289. Press, INC., Wesport, CT.
- Lage, M.A.; Simal, J. y Toca, M.J. (1980). Aplicación de la segunda derivada del espectro para el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina C". *Anales de Bromatología XXXII-4*: 353-360.
- Lage, M.A.; Simal, J. y Salgado, G. (1983). Determinación de almidón en alimentos. *Trabajos compostelanos de Biología*, 10: 15-25.
- Lanser, A.C.; List, G.R.; Holloway, R.K. y Mounts, T.L. (1991). FTIR estimation of free fatty acid content in crude oils extracted from damaged soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 448-449.
- Loiudice, R.; Impembo, M.; Laratta, B.; Villari, G.; Lo Voi, A.; Siviero, P. y Castaldo, D. (1995). Composition of San Marzano tomato varieties. *Food Chem.*, 53: 81-89.
- López-Carrillo, L., Hernández, M., y Dubrow, R. (1994). Chilli pepper consumption and gastric cancer in Mexico: A case-control study. *American Journal of Epidemiology*, 139:3, 263-71.
- López-Hernández, J.; Vázquez-Odériz, M.L.; Vázquez-Blanco, M.E.; Romero-Rodríguez, A. y Simal-Lozano, J. (1993). HPLC determination of major pigments in the bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1613-1615.

- López-Hernández, J.; González-Castro, M.J.; Vázquez-Blanco, M.E.; Vázquez-Odériz, M.L. y Simal-Lozano, J. (1994). HPLC determination of sugars and starch in green beans. *J. Food Sci.* 59(5): 1048-1049.
- López-Hernández, J.; Oruña-Concha, M.J.; Simal-Lozano, J.; Vázquez-Blanco, M.E. y González-Castro, M.J. (1996, a). Chemical composition of Padrón peppers grown in Galicia (NW Spain). *Food Chemistry*. En Prensa.
- López-Hernández, J.; Oruña-Concha, M.J.; Simal-Lozano, J.; González-Castro, M.J. y Vázquez-Blanco, M.E. (1996, b). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in cayenne pepper and Padrón peppers by HPLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. En Prensa.
- López-Hernández, J.; Vázquez-Blanco, M.E.; González-Castro, M.J.; Simal-Lozano, J.; Vázquez-Odériz, M.L. y Oruña-Concha, M.J. (1996, c). Determination of dietary fibre content of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of Galicia (N.W. Spain). *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. En Prensa.
- López-Hernández, J.; González-Castro, M.J.; Simal-Lozano, J.; Vázquez-Blanco, M.E.; Vázquez-Odériz, M.L. (1996, d). GC determination of fatty acids in green beans grown in Galicia (N.W. Spain). *Grasas y Aceites*. En Prensa.
- Luning, P. A., Rijk, T., Wichers, H. J. y Roozen, J. P. (1994). Gas Chromatography, mass Spectrometry, and Sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 977-983.
- Luthi, H. (1958). Das aroma des fruchtsäfte, seine gewinnung und erhaltung. *Flüssiges Obst.*, 25/10, X11-X17.
- LLoyd, L.E.; Mcdonald, B.E. y Crampton, E.W. Fundamentals of Nutrition. (1982). Ed. Acribia, Zaragoza, pp.205-209.
- Masada, Y., Hashimoto, K., Inoue, T. y Suzuki, M. (1971). Analysis of the pungent principles of *Capsicum annuum* by combined gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food Sci.*, 36, 858.
- Mataix, J. (1993). Tabal de Composición de Alimentos Españoles. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada. Granada.
- Mateos, A. y Carbonell, E. (1990). Análisis de la fracción aromática de alimentos. Técnicas de extracción y concentración. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 30/4, 431-444.

- Medina, I., Suarez, J. J. y Martinez, J. L. (1994). Aromas alimentarios (I). *Alimentación, Equipos y Tecnología*. nº 6, pp.87-92.
- Moreno Martin y Torre Boronat. (1979). Lecciones de Bromatología. Facultad De Farmacia, Universidad de Barcelona.
- Moreno Martín, F. y De La Torre Boronat, M.C. (1983). Lecciones de Bromatología. Tomo I. De. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- Mozsik, G.; Javor, T.; Toth, G.; Zsoldos, T. y Tigyy, A. (1984). Interrelationships between the gastric cytoprotective effects of vitamin A and  $\beta$ -carotene and the gastric mucosal superoxide dismutase activity in rats. *Acta Phys. Hung.* 64: 315-318.
- Mueller, H.R. (1990). The effects of industrial handling on Micronutrients. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 36: S47-S55.
- Murray, L.F. y Moss, R. (1990). Estimation of fat acidity in milled wheat products. Colorimetric determination. *J. Cereal Sci.* 11: 171-177.
- Murray, K. E. y Whitfield, F. B. (1975). The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sci. Food Agr.*, 26, 973-986.
- Naik, S.N. y Lentz, H. (1989). Extraction of perfumes and flavours from plant materials with liquid carbon dioxide under liquid-vapor equilibrium conditions. *Fluid Phase Equilibria*, 49, 115-126.
- Nahar, N.; Mosihuzzaman, M. y Dey, S.K. (1993). Analysis of free sugar and dietary fibre of some vegetables of Bangladesh. *Food Chem.* 46: 397-400.
- Ohsumi, C., Hayashi, T., Kubota, K. y Kobayashi, A. (1993). Volatile flavor compounds formed in an interspecific hybrid between onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1808-1810.
- Okuse I. y Ryugo, K. (1981). Compositional Changes in the Developing "Hayward" Kiwi Fruit in California. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* 106(1): 73-76.
- Oruña-Concha, M.J.; González-Castro, M.J.; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, a). Evolution of Sugar, Starch, Pectin and Insoluble Fibre Contents in Frozen Green beans and Padrón Peppers. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 92 (9): 278-281.

- Oruña-Concha, M.J.; González-Castro, M.J.; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, b). "Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and Padrón peppers by HPLC". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. En Prensa.
- Oruña-Concha, M.J.; González-Castro, M.J.; López-Hernández, J. y Simal-Lozano, J. (1996, c). "Effects of freezing on the pigment of green beans and Padrón peppers". *Z Lebensmittel Unters For*. En Prensa.
- Padula, M. y Rodríguez-Amaya, D.B. (1987). Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. *Acta Alimentaria*, 16(3): 209-216.
- Paillard, N. (1967). Factors influencing flavour formation in fruits. Schreier, P. (Ed.), *Flavour 81*. Berlin, New York: Walter de Gruyter, pp. 479-507.
- Park, Y.W. y Washington, A.C. (1993). Fatty acid composition of goat organ and muscle meat of alpine and nubian breeds. *J. Food Sci.* 58(2):245-248.
- Penner, M.H. y Kim, S. (1991). Nonstarch polysaccharide fractions of raw, processed and cooked carrots. *J. Food Sci.*, 56(6): 1593-1599.
- Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J. y Olías, J. M. (1993). Estudio comparativo de los perfiles aromáticos de manzana, plátano y fresa. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 33(6), 665-677.
- Picha, D. H. (1985). Organic Acid Determination in Sweet Potatoes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 33: 743-745.
- Primo Yúfera, E. (1979). Química Agrícola III Alimentos. Ed. Alhambra, Madrid, 1ª edn.
- Rahman, S.M.M. y Westerlun, M. (1991). Free sugars and dietary fibre in some fruits of Bangladesh. *Food Chem.* 42: 19-28.
- Ranganna, S. (1986). Handbook of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products. Ed. Tata McGraw-Hill, Delhi, 2ª edn,
- Reid, M.S.; Heatherbell, D.A. y Pratt, H.K. (1982). Seasonal patterns in chemical composition of the fruit of *Actinidia chinensis*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107(2): 316-319.

- Reverchon , E. y Senatore, F. (1994). Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 154-158.
- Rico Avila, J. (1983). Cultivo del pimiento de carne gruesa en invernadero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid.
- Rodríguez, M.D.; Redondo, A. y Villanueva, M.J. (1992). Study of dietary fibre content in cucumber by gravimetric and spectrophotometric methods. *Food Chem.* 43: 295-298.
- Rymal, K. S. Cosper, R. D., y Smith, D. A. (1984). Injection-extraction procedure for rapid determination of relative pungency in fresh Jalapeño peppers. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 658-9.
- Saccani, G.; Gherardi, S; Trifirò, A.; Soresi Bordini, C.; Calza, M. y Freddi, C. (1995). Use of ion chromatography for the measurement of organic acids in fruit juices. *J. chromatogr. A*, 706:395-403.
- Sagrero-Nieves, L., De Pooter, H.L. y Van Wassenhove, F.A. (1989). Major volatile Constituents from the fruit of Mammee Apple (*Mammea americana* L.). *J. Food Composition and Analysis* 2, 382:385.
- Saitoh, K.; Awaka, I. y Suzuki, N. (1995). Determination of chlorophylls by reversed phase high-performance liquid chromatography with isocratic elution and the column-switching technique. *J. Chromatogr A*, 693: 176-180.
- Sakamoto, S., Goda, Y., Maitani, T., Yamada, T., Nunomura, O., y Ishikawa, K. (1979). High-performance liquid chromatographic analyses of capsaicinoids and their phenolic intermediates in *Capsicum annuum* to characterize their biosynthetic status. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1141-2.
- Sauri, E., Nadal, M. J., y Izquierdo, L. (1988). Aislamiento de los constituyentes volátiles del zumo de naranja por extracción con disolvente y por arrastre con nitrógeno. Estudio cuantitativo con zumos modelo. *Rev. Agroquim. tecnol. Aliment.*, 28(3), 370-378.
- Sechi, G. (1967). I Nostri Alimenti. De. Ulrico. Hoepli. Milano.
- Selman, J.D. y Rolfe, E.J. (1982). Effects of water blanching on pea seeds. II. Changes in vitamin C content. *J.Fd. Technol.*, 17: 219-234.
- Senatore, F. (1990). Fatty acids, free aminoacids and sterols from some species of *Stropharia* and *Stereum*. *Biochem. systematics and ecology*. 18(2/3): 103-106.



- Sinha, N.K., Guyer, D.E., Gage, D.A. y Lira, C.T. (1992). Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavors and their analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 842-845.
- Shinohara, A., Sato, A., Ishii, H. y Onda, N. (1991). Capillary Headspace-Gas Chromatography for the characterization of the flavour of fresh vegetables. *Chromatographia*. Vol. 32, No. 7/8, pp.357-364.
- Sievers, G. y Hynninen, P.H. (1977). Thin-layer chromatography of chlorophylls and their derivatives on cellulose layers. *J. Chromatogr.* 134:359-364.
- Simal-Lozano, J.; López-Hernández, J. y Vázquez-Oderiz, M.L. (1986). Contribución al estudio sobre el pimiento de Padrón. II.- Determinación de Humedad. *Técnicas de Laboratorio*, 132, 449-452.
- Sutton, K.H. y Mouat, C.L. (1990). Determination of damaged starch in wheat flours by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.* 11: 235-242.
- Suzuki, T., Kawada, T. y Iwai, K. (1980). Effective separation of capsaicin and its analogues by reversed-phase high performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 198, 217-23.
- Thompson, C.O. y Trenerry, V.C. (1995). A rapid method for the determination of total L-ascorbic acid in fruits and vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem.*, 53: 43-50.
- Tijsskens, L.M.M.; Koek, P.C.; Van der Meer, M.A.; Schijvens, E.P.H.M. y De Witte, Y. (1979). Quality changes in frozen Brussels sprouts during storage. II. Objective quality parameters: texture, colour, ascorbic acid content and microbiological growth. *J. Fd. Technol.*, 14: 301-313.
- Todd, P. H., Bensinger, M. G. y Biftu, T. (1977). Determination of pungency due to capsicum by gas-liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 42, 660-80.
- Trowell, H.; Southgate, D.A.; Wolever, T.M.S.; Leeds, A.R.; Gassui, M.A. y Jenkins, D.J.A. (1976). Dietary fibre redefined. *Lancet* 1: 967.
- Van Den, T.; Biermann, C.J. y Marlett, J.A. 9. (1986). Simple sugars, oligosaccharides, and starch concentrations in raw and cooked sweet potato. *J. Agric. Food Chem.*, 34: 421-425.
- Van Ruth, S. M. y Roozen, J. P. (1994). Gas chromatography/sniffing port analysis and sensory evaluation of commercially dried bell peppers (*Capsicum annuum*) after rehydration. *Food Chem.*, 51, 165-170.

- Van Ruth, S. M., Roozen, J. P. y Cozijnsen, J. L. (1995). Volatile compounds of rehydrated french beans, bell peppers and leeks. Part 1. Flavour release in the mouth and in three mouth model systems. *Food Chem.*, 53, 15-22.
- Vázquez-Blanco, M.E.; Lopez-Hernández, J.; Vázquez-Odériz, M.L.; Simal-Lozano, J. y González-Castro, M.J. (1995). Determination of pectins by HPLC. A comparison of two methods applied to green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Chromatogr. Sci.* 33: 551-553.
- Vázquez-Blanco, M.E.; Vázquez-Odériz, M.L.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J. y Romero-Rodríguez, M.A. (1993). HPLC determination of pectins in raspberries as galacturonic acid and optimization using forward optical scanning. *J. Chromatogr. Sci.* 31:477-479.
- Vázquez-Odériz, M.L (1988). Tipificación del pimiento “tipo Padrón” producido en Galicia. Tesis Doctoral.
- Vázquez-Odériz, M.L.; Vázquez-Blanco, M.E.; López-Hernández, J. y Romero-Rodríguez, M.A. (1992). Due metodi spettrofotometrici per determinare differenti frazioni pectiche. Comparazione ed applicazione a sette varietà di lamponi. *Industrie Alimentari XXXI*: 533-536.
- Vázquez-Odériz, M.L.; Vázquez-Blanco, M.E.; López-Hernández, J.; Simal-Lozano, J. y Romero-Rodríguez, M.A. (1994). Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *J. AOAC International*, 77(4): 1056-1059.
- Vidal-Valverde, C. y Frias, J. (1991). Legume processing effects on dietary fiber components. *J. Food Sci.* 56(5): 1350-1352.
- Villanueva, M.J.; Redondo, A.; Rodríguez, M.D. (1990). Determinación de sustancias pécticas en berenjena y calabacín por dos métodos espectrofotométricos. *Anal. Bromatol.*, XLII-1: 57-64.
- Villanueva, M.J.; Redondo, A.; Rodríguez, M.D. y García, B. (1993). Determination of dietary fibre by the AOAC method in raw and processed vegetables: peas samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 345: 247-249.
- White, R.C.; Jones, I.D.; Gibbs, E. y Butler, L.S. (1972). Fluorometric estimation of chlorophylls, chlorophyllides, pheophytins and pheophorbides in mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 20(4): 773-777.

Willaert, C. H., Dirinck, P. J., De Pooter, H. L. y Schamp, N. M. (1983). Objective measurement of aroma quality of Golden Delicious apples as function of controlled atmosphere storage time. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 809-813.

Wills, R.H.H.; Lee, T.H.; Mcglason, W.B.; Hall, E.G. y Graham, D. (1984). Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas post recolección. Ed. Acribia, S.A.

Wilson, L.A., Senechal, N.P. y Widrlechner, M.P. (1992). Headspace analysis of the volatile oils of *Agastache*. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1362-1366.

Wu, C. y Liou, S. (1986). Effect on tissue disruption on volatile constituents of bell peppers. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 770-772

Yoder, B.J. y Daley, L.S. (1990). Development of a visible spectroscopic method for determining chlorophyll *a* and *b* in vivo in leaf samples. *Spectroscopy* 5(8): 44-50.

